

**Untersuchungen zur Struktur
von Acetyl-CoA-Carboxylase aus Hefe**

Joachim Spieß

1976

UNTERSUCHUNGEN ZUR STRUKTUR VON
ACETYL-COA-CARBOXYLASE AUS HEFE

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Joachim Spieß

München 1976



1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.4.76

THE FOLLOWING IS A LIST OF THE NAMES OF THE
PERSONS WHOSE NAMES ARE ON THE LIST OF THE
PERSONS WHOSE NAMES ARE ON THE LIST OF THE
PERSONS WHOSE NAMES ARE ON THE LIST OF THE

THE FOLLOWING IS A LIST OF THE NAMES OF THE
PERSONS WHOSE NAMES ARE ON THE LIST OF THE
PERSONS WHOSE NAMES ARE ON THE LIST OF THE
PERSONS WHOSE NAMES ARE ON THE LIST OF THE

THE FOLLOWING IS A LIST OF THE NAMES OF THE
PERSONS WHOSE NAMES ARE ON THE LIST OF THE
PERSONS WHOSE NAMES ARE ON THE LIST OF THE
PERSONS WHOSE NAMES ARE ON THE LIST OF THE

THE FOLLOWING IS A LIST OF THE NAMES OF THE
PERSONS WHOSE NAMES ARE ON THE LIST OF THE
PERSONS WHOSE NAMES ARE ON THE LIST OF THE
PERSONS WHOSE NAMES ARE ON THE LIST OF THE

Die vorliegende Arbeit wurde von April 1973 bis Januar 1976 unter Anleitung von Professor Dr. Feodor Lynen im Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, und im Institut für Biochemie der Universität München ausgeführt.

Bei Herrn Professor Lynen möchte ich mich sehr herzlich für die Anregung zu dieser Arbeit und die persönliche Unterstützung bedanken.

Frau C. Döcker danke ich für ihre engagierte und zuverlässige Assistenz seit Mai 1974.

Den wissenschaftlichen Mitarbeitern und Doktoranden der Abteilung von Professor Lynen, Max-Planck-Institut für Biochemie, sowie Herrn Dr. B. Hamprecht bin ich durch zahlreiche Diskussionen verpflichtet.

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINFÜHRUNG	1
II.	ERGEBNISSE	4
A.	Isolierung von Acetyl-CoA-Carboxylase aus Bierhefe	4
B.	Spaltung von Acetyl-CoA-Carboxylase mit Natriumdodecylsulfat	9
C.	Aminosäureanalyse von Acetyl-CoA-Carboxy- lase	16
D.	Endgruppenbestimmung von Acetyl-CoA- Carboxylase	18
E.	Untersuchung der Inaktivierung und Reakti- vierung von Acetyl-CoA-Carboxylase	29
III.	DISKUSSION	40
IV.	EXPERIMENTELLES	45
A.	Verwendete Geräte	45
B.	Enzyme und Chemikalien	45
C.	Enzymaktivitäten	46
a.	Acetyl-CoA-Carboxylase	46
b.	Pyruvatcarboxylase	46
c.	ATP-Harnstoff-Amidolyase	46
d.	Biotincarboxylase (ATP-ADP-Austausch- test)	47
D.	Darstellung und Bestimmung von Acetyl-CoA	48
E.	Proteinbestimmung	48
F.	Isolierung von Acetyl-CoA-Carboxylase aus Bierhefe	48
G.	Isoelektrische Fokussierung	51

H.	Polyacrylamidgel-Elektrophoresen	52
a.	Disk-Elektrophoresen	52
b.	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen	52
I.	Aminosäureanalyse	53
K.	Proteinhydrolyse	53
a.	Hydrolyse mit HCl	54
b.	Hydrolyse mit 3 N p-Toluolsulfonsäure	54
c.	Hydrolyse mit 4 N Methansulfonsäure	55
L.	Perameisensäure-Oxidation	55
M.	Endgruppenbestimmungen	55
a.	Dansylchlorid-Methode	55
b.	Verdauung mit Leucinaminopeptidase	56
c.	Verdauung mit Carboxypeptidasen	57
V.	ZUSAMMENFASSUNG	59
	LITERATURVERZEICHNIS	61

Abkürzungen:

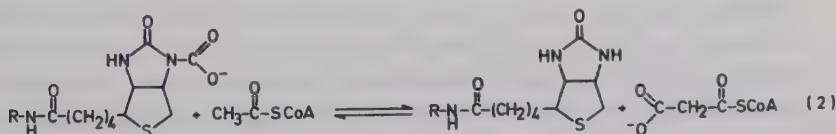
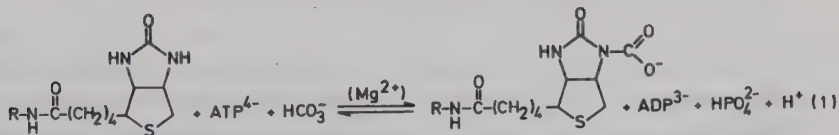
CoA	Coenzym A
Dansyl-	1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfonyl-
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
DFP	Diisopropylfluorophosphat
EDTA	Äthylendiamin-tetraessigsäure
Tris	2-Hydroxymethyl-2-amino-propan-1,3-diol

I. EINFÜHRUNG

Der erste Schritt der Fettsäurebiosynthese besteht in der Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA, das eine für die folgenden Esterkondensationen genügend azide Methylengruppe enthält.

Die Reaktion wird von dem Biotinenzym Acetyl-CoA-Carboxylase katalysiert und stellt, zumindest in der tierischen Zelle, den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Fettsäurebiosynthese dar (1).

In Abb. 1 ist diese Carboxylierungsreaktion als Folge von zwei Teilreaktionen formuliert. In der ersten Teilreaktion wird Biotin in einer ATP, Mg^{2+} und HCO_3^- abhängigen Reaktion carboxyliert. In der zweiten Teilreaktion findet dann ein Carboxyltransfer auf Acetyl-CoA statt.



Summe:



$R-NH_2$: Acetyl-CoA-Carboxylase-Apoenzym

Abb. 1 Reaktionsgleichung der Acetyl-CoA-Carboxylierung durch Acetyl-CoA-Carboxylase

Eine solche Beschreibung geht davon aus, daß Acetyl-CoA-Carboxylase drei Funktionen enthält: eine biotincarboxylierende, eine biotintragende und eine carboxyltransferierende Funktion. Dieses Prinzip eines dreiteiligen Aufbaus kann allen Biotinenzymen als charakteristische Eigenschaft zugeschrieben werden.

Die Berechtigung eines solchen Formalismus ist vor allem aus den Untersuchungsergebnissen der Arbeitskreise von Lane (2), Vagelos (3) und Wood (4-7) abzuleiten. Nach den Experimenten, die in den Laboratorien von Lane (2) und Vagelos (3) durchgeführt wurden, stellt Acetyl-CoA-Carboxylase aus E.coli ein Enzymsystem dar, das aus zwei biotinfreien, vollständig trennbaren Enzymen, einer Biotincarboxylase und einer Carboxyltransferase, und einem Biotinträgerprotein (BCCP) besteht. Insgesamt wird der Enzymkomplex aus vier nicht-identischen Polypeptidketten aufgebaut.

Guchhait et al. (8) schlugen auf der Basis ihrer Ergebnisse ein Modell der Wirkungsweise der Acetyl-CoA-Carboxylase aus E.coli vor. Danach oszilliert ein aus Biotinyllysin bestehender, etwa 14 Å langer Arm des Carrierproteins zwischen den beiden Teilenzymen Biotincarboxylase und Carboxyltransferase.

Im Laboratorium von Wood (4-7) ist es gelungen, das Prinzip eines dreiteiligen Aufbaus der Biotinenzyme an Methylmalonyl-CoA-Transcarboxylase aus P.shermanii zu bestätigen. Der Enzymkomplex aus P.shermanii unterscheidet sich von der Acetyl-CoA-Carboxylase aus E.coli insofern, als nicht HCO_3^- sondern Methylmalonyl-CoA ohne ATP-Verbrauch als CO_2 -Donor fungiert. Im übrigen sind auch hier Biotincarboxylase, Carboxyltransferase und Biotin auf getrennten Polypeptiden lokalisiert. Trotz vieler Versuche erwies es sich bisher als unmöglich, Biotinenzyme aus eukaryoten Organismen in Teilenzyme zu zerlegen. So zeigen nach bisherigen Untersuchungen die Pyruvatcarboxylasen aus Leber von Huhn, Truthahn, Kalb und Ratte tetramere Strukturen aus je vier identischen Polypeptidketten (9,10). Auch die Acetyl-CoA-Carboxylase aus Rattenleber wird nach neueren Untersuchungen (11) sehr wahrscheinlich aus identischen Polypeptidketten aufgebaut. Diese

Ergebnisse können darauf zurückgeführt werden, daß die untersuchten Biotinenzyme aus eukaryoten Organismen Polypeptidketten enthalten, die mehrere funktionelle Einheiten in kovalenter Verknüpfung tragen.

In diesem Zusammenhang ist interessant, daß allgemein im Rahmen der Enzymevolution eine Entwicklung begünstigt zu sein scheint, die von Enzymsystemen aus unifunktionellen Einzelenzymen zu Multienzymkomplexen aus größeren multifunktionellen Polypeptidketten führt. Zum Beispiel stellt die Fettsäuresynthetase in *E.coli*, also einem prokaryoten Organismus, ein Enzymsystem dar, das aus sieben vollständig trennbaren Proteinen besteht (12), während die eukaryote Hefe einen Multienzymkomplex Fettsäuresynthetase enthält, der aus nur zwei nicht-identischen multifunktionellen Polypeptiden gebildet wird (13). In ähnlicher Weise unterscheidet sich die Tryptophansynthetase aus eukaryoten und prokaryoten Organismen (14).

Die Bildung solcher multifunktionaler Polypeptide wird möglicherweise durch Genfusion realisiert, wie sie Yourno et al. (15) experimentell gelungen ist.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Struktur von Acetyl-CoA-Carboxylase aus Bierhefe, um Vergleiche mit der Struktur anderer Biotinenzyme zu ermöglichen.

Ausgangspunkt der Untersuchungen sind die Arbeiten Sumpers et al. (16,17). Sumper et al. (16,17) wiesen nach, daß Acetyl-CoA-Carboxylase aus Bierhefe nach Dialyse gegen 0.1 M NH_3 unter Inaktivierung in Spaltstücke dissoziiert, die in der Rohrzucker-dichtegradienten-Zentrifugation durch die Sedimentationskoeffizienten 12 S, 9 S und 6 S charakterisiert sind. Elektrophoretische Untersuchungen führten Sumper et al. (16,17) zu der Schlussfolgerung, daß alle in alkalischem Medium gebildeten Aggregate Mehrfache der Biotin enthaltenden 6 S-Untereinheit darstellen. So konnten das native Enzym, das 12 S- und 9 S-Spaltstück als Tetrameres, Trimeres und Dimeres der 6 S-Untereinheit identifiziert werden. Die 6 S-Untereinheit besitzt, wie immunchemische Experimente ergaben (17), alle antigenen Determinanten des nativen Enzyms.

Versuche Sumpers und Lynens (16), die 6 S-Untereinheit durch Einwirkung von 8 M Harnstoff und 0.1 M Thioglykol aufzuspalten, waren erfolglos.

In Fortsetzung dieser Arbeiten wird angestrebt, den Multienzymkomplex Acetyl-CoA-Carboxylase aus Hefe in die ihn bildenden Polypeptidketten zu zerlegen und diese Polypeptidketten nach Molekulargewicht und Endgruppen zu charakterisieren. Außerdem soll die Inaktivierung von Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase in alkalischem Medium genauer untersucht werden, um den Zusammenhang zwischen Struktur und Aktivität dieses Multienzymkomplexes besser verstehen zu können.

II. ERGEBNISSE

A. Isolierung von Acetyl-CoA Carboxylase aus Bierhefe.

Acetyl-CoA-Carboxylase wird aus Bierhefe angereichert, die aus der stationären Wachstumsphase einer Reinkultur vor der ersten Gärführung stammt.

Das Isolierungsverfahren entspricht in der Folge der Anreicherungsschritte zum großen Teil den Reinigungsprozeduren, die von Sumper und Riepertinger (17), sowie Matsuhashi et al. (18) vorgeschlagen wurden.

Die Hefezellen werden bei 0 bis +2°C in dem von Merckenschlager et al. (19) entwickelten Homogenisator durch Schütteln mit Glasperlen aufgeschlossen. Nach Abzentrifugation der Zelltrümmer wird der so erhaltene Rohextrakt einer Ammoniumsulfatfällung unterworfen. Eine Ultrazentrifugation und zwei Fraktionierungen mit Polyäthylenglykol des mittleren Molekulargewichts 6 000 folgen.

Abschließend finden zwei Säulenchromatographie-Schritte an den Ionenaustauschern DEAE-Sephadex (A25) und Phosphocellulose statt.

Alle Anreicherungsschritte erfolgen in Gegenwart von 5 mM Dithiothreitol. Um Protease-Aktivitäten zu vermeiden, wird der Hefesuspension unmittelbar vor und nach dem Zellaufschluß der Protease-Inhibitor Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) in äthanolischer Lösung zugesetzt. Die Anreicherung wird durch Messung der Proteinkonzentration und der Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivität kontrolliert. Protein wird mit der Biuretmethode nach Beisenherz et al. (20) und teilweise durch Absorptionsmessung bei 280 und 260 nm nach Warburg und Christian (21) bestimmt. Nach den chromatographischen Anreicherungsschritten liefern beide Methoden übereinstimmende Werte. Zur Aktivitätsbestimmung wird die Bildungsgeschwindigkeit von Malonyl-CoA mit Fettsäuresynthetase als Indikatorenzym im optischen Test nach Matsushashi et al. (18) gemessen. Dieser Test ist doppelt so empfindlich wie die Aktivitätsbestimmung mit Hilfe von Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase im optischen Test nach Matsushashi et al. (18) und weist bei den ersten Anreicherungsschritten geringere Blindwerte auf. Mit weitgehend gereinigten Präparaten ergeben beide Tests gleiche Werte.

In den meisten Versuchen war es wegen hoher Blindwerte unmöglich, reproduzierbar die Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivität des Rohextrakts im optischen Test mit Fettsäuresynthetase zu messen. Bei Anreicherungen, bei denen die Aktivitätsmessung möglich war, wurde eine spezifische Aktivität von etwa 0.005 E/mg gefunden.

Bei der Ausarbeitung der Polyäthylenglykolfractionierungen, wie auch der chromatographischen Schritte, wurde der isoelektrische Punkt von Acetyl-CoA-Carboxylase berücksichtigt. Er wurde nach Vesterberg (22) in einer Elektrofokussiersäule bestimmt und beträgt 5.4 ± 0.1 . Die Polyäthylenglykolfällungen führen in den meisten Versuchen zu einer Aktivitätszunahme von etwa 10 %. Nach diesen Fraktionierungen wird in manchen Anreicherungen ein Gelschritt eingefügt. Bei einem Gel-Protein-Verhältnis von 5 : 1 wird Acetyl-CoA-Carboxylase in 0.1 M Kaliumphosphat, 20 % (v/v) Glycerin, 5 mM Dithiothreitol, pH = 6.5, adsorbiert. Desorption

erfolgt mit einem Puffer gleicher Zusammensetzung bei $\text{pH} = 7.5$. Obwohl das Enzym nach der Desorption sofort durch Zusatz von festem Polyäthylenglykol 6 000 gefällt und einer Ultrazentrifugation unterworfen wird, treten in der Regel fädige Denaturierungen mit Aktivitätsverlusten von 10 bis 50 % auf. Deswegen wird dieser Schritt trotz seiner guten Anreicherungswirkung normalerweise fortgelassen.

Von der DEAE-Sephadex (A25)-Säule wird Acetyl-CoA-Carboxylase durch einen linearen NaCl-Konzentrationsgradienten in glycerinhaltigem Imidazolpuffer eluiert. Dabei treten Proteinkonzentrationen unter 0.1 mg/ml auf. Konzentrierung durch Fällung mit festem Ammoniumsulfat oder durch Membranultrafiltrationen führen zu Aktivitätsverlusten und Absinken der spezifischen Aktivität. Dagegen gelingt die Konzentrierung durch Fällung mit festem Polyäthylenglykol 6 000 nach Zusatz von Serumalbumin. Das zugesetzte Serumalbumin wird im Leervolumen der Phosphocellulose-Chromatographie wieder abgetrennt.

Weitere Einzelheiten des Anreicherungsverfahrens sind dem Experimentalteil zu entnehmen.

Tab. 1 zeigt das Ergebnis einer Anreicherung von Acetyl-CoA-Carboxylase. Die maximale spezifische Aktivität von 9 E/mg wurde in einem Versuch unter Einschluß des beschriebenen Gelschritts in einer 1 900-fachen Anreicherung erzielt. Enzym dieser spezifischen Aktivität verlor innerhalb von 17 Monaten nur 6 % seiner Aktivität.

Da sich Pyruvatcarboxylase und ATP-Harnstoff-Amidolyase aus Bierhefe nach Sumper (17,23) sehr ähnlich wie Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase verhalten, wurde die Aktivität dieser beiden Enzyme in den einzelnen Fraktionen der Acetyl-CoA-Carboxylase-Anreicherung gemessen. Es stellte sich heraus, daß Pyruvat-Carboxylase in der ersten Polyäthylenglykolfraktionierung abgetrennt wird. ATP-Harnstoff-Amidolyase ist in keiner Fraktion nachweisbar. Um den Reinheitsgrad von Acetyl-CoA-Carboxylase der Phosphocellulosefraktion abschätzen zu können, werden Glycerindichtegradienten-Zentrifugationen und Disk-Elektrophoresen durchgeführt. In der Glycerindichtegradienten-Zentrifugation ergeben Acetyl-CoA-Carboxylase-

Tab.1 Anreicherung von Acetyl-CoA-Carboxylase aus Bierhefe
1 kg Bierhefe (Feuchtgewicht) wurde eingesetzt

Fraktion	Protein (mg)	Gesamt- aktivität (Σ)	spezifische Aktivität (Σ /mg)	Anreich. Faktor	Ausbeute (%)
Rohextrakt	89 000	-	-	-	-
40% Ammonium- sulfat	12 250	337	0.028		100 (!)
Ultrasentri- fugation	4 820	284	0.059	2.1	84
1.Polyäthylen- glykolfrakt.	997	229	0.230	3.9	68
2.Polyäthylen- glykolfrakt.	204	175	0.860	3.7	52
DEAE-Sephadex (A 25)		100	5.54	6.4	30
Phosphocellu- lose	12	91	7.58	1.4	27

Aktivität und Absorption bei 230 nm ein einziges gemeinsames Maximum (Abb. 2). Disk-Elektrophoresen der Phosphocellulose-Fraktion in geringfügig geänderten System 1 nach Maurer (24) zeigen eine intensiv gefärbte Bande und eine weniger weit eingewanderte schwach angefärbte Bande (Abb. 3). Der Reinheitsgrad von Acetyl-CoA-Carboxylase der Phosphocellulose-Fraktion wird entsprechend auf etwa 95 % geschätzt.

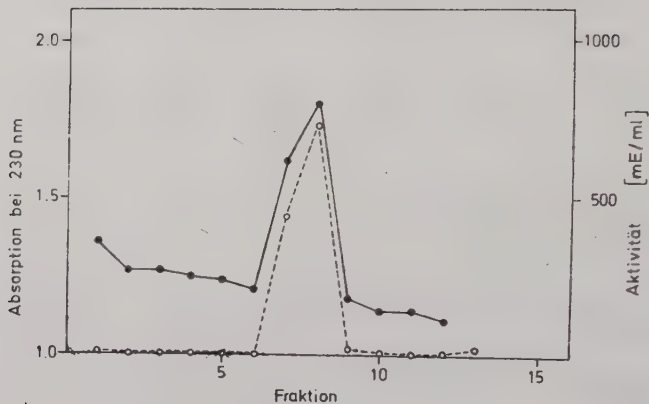


Abb. 2 Glycerindichtegradienten-Zentrifugation von Acetyl-CoA-Carboxylase

0,16 mg Acetyl-CoA-Carboxylase der Phosphocellulose Fraktion werden auf einen linearen Glycerindichtegradienten (15-40 % w/v) in Puffer aus 0,3 M Kaliumphosphat und 5 mM Dithiothreitol, pH = 6,5, aufgesetzt und 16,5 h bei +3°C und 40 000 Upm in einer L2-65 B-Ultrazentrifuge (Beckman) mit einem SW 41 Rotor zentrifugiert. Fraktionierung erfolgt nach Anstechen des Bodens.

Durchgezogene Kurve:

Absorption bei 230 nm

Gestrichelte Kurve:

Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivität
in mE/ml

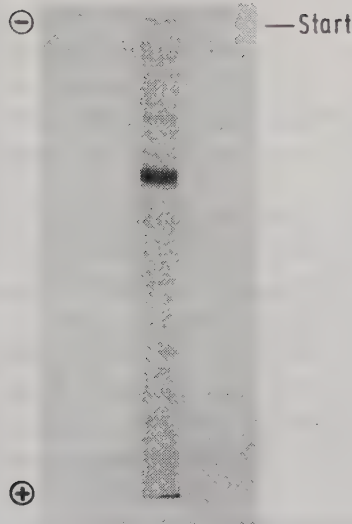


Abb. 3 Disk-Elektrophorese von Acetyl-CoA-Carboxylase

2.5 μ g Acetyl-CoA-Carboxylase der Phosphocellulose-Fraktion werden in ein Gelröhrchen (0.5x7 cm) gegeben, das ein Obergel (3.75 % Acrylamid) und ein Untergel (6.0 % Acrylamid) enthält. Die Elektrophorese erfolgt bei 2.5 mA und +2°C. (Dauer: 2 h, Anodenrichtung von oben nach unten). Näheres s. Experimentaltteil.

B. Spaltung von Acetyl-CoA-Carboxylase mit Natriumdodecylsulfat.

Durch das Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) werden Proteine in die sie bildenden Polypeptidketten zerlegt (25). Es entstehen negativ geladene Protein-SDS-Komplexe, die in der Polyacrylamid-gel-Elektrophorese nach Molekulargewichten aufgetrennt werden (25,26,27).

Um einen Einblick in die Struktur von Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase zu erhalten, wird deswegen Enzym der Phosphocellulose-Fraktion in Gegenwart von 2 % SDS, 8 M Harnstoff und 0.64 M Thioglykol erhitzt

und nach dem Abkühlen mit 2 % SDS und 0.64 M Thioglykol enthalten-dem Puffer 1 : 2 verdünnt. Die anschließende Elektrophorese erfolgt in Plattengelen aus Polyacrylamid mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 5 bis 15 % Acrylamid in Anodenrichtung und einem weitmaschigen Obergel aus 3 % Acrylamid. Gelzusammensetzung und Elektrodenpuffer entsprechen den Angaben Laemmli (28).

Abb. 4 zeigt das Ergebnis einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese der Phosphocellulose-Fraktion und der Markerproteine E.coli-RNA-Polymerase mit geringem σ -Anteil und Hefe-Fettsäuresynthetase. Die Phosphocellulose-Fraktion ergibt eine intensiv angefärbte Bande und drei weiter eingewanderte sehr schwach angefärbte Banden. Der Intensitätsunterschied ist so groß, daß im Hinblick auf die große spezifische Aktivität der Präparation (s. Tab. 1) allein die intensiv angefärbte Bande der Acetyl-CoA-Carboxylase zugeordnet wird.

Auch wenn nur 0.5 μ g Protein der Phosphocellulose-Fraktion aufgetragen werden, spaltet die der Acetyl-CoA-Carboxylase zugeordnete Bande nicht auf. Dagegen spalten die Markerproteine, deren Molekulargewichte in der gleichen Größenordnung wie das aus Acetyl-CoA-Carboxylase stammende Spaltprodukt liegen, die RNA-Polymerase-untereinheiten β' und β , sowie die Fettsäuresynthetase-Komponenten A, B und C unter denselben Versuchsbedingungen auf.

Die SDS-Spaltung von Protein der Phosphocellulose-Fraktion ist weitgehend unabhängig von der Temperatur des Spaltansatzes. Inkubation bei verschiedenen Temperaturen von 23°C bis 80°C führt jeweils zum gleichen Bandenmuster in der Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Abb. 5 zeigt das Ergebnis von Spaltungen bei 37°C und 75°C.

Die Polypeptide der Phosphocellulose-Fraktion, welche den schwach angefärbten Banden in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (s. Abb. 4, Abb. 5) entsprechen, können durch zusätzliche Reinigungsschritte weitgehend entfernt werden.

So ergeben die Acetyl-CoA-Carboxylase enthaltenden Fraktionen einer Glycerindichtegradienten-Zentrifugation (Abb. 2) in der SDS-Poly-

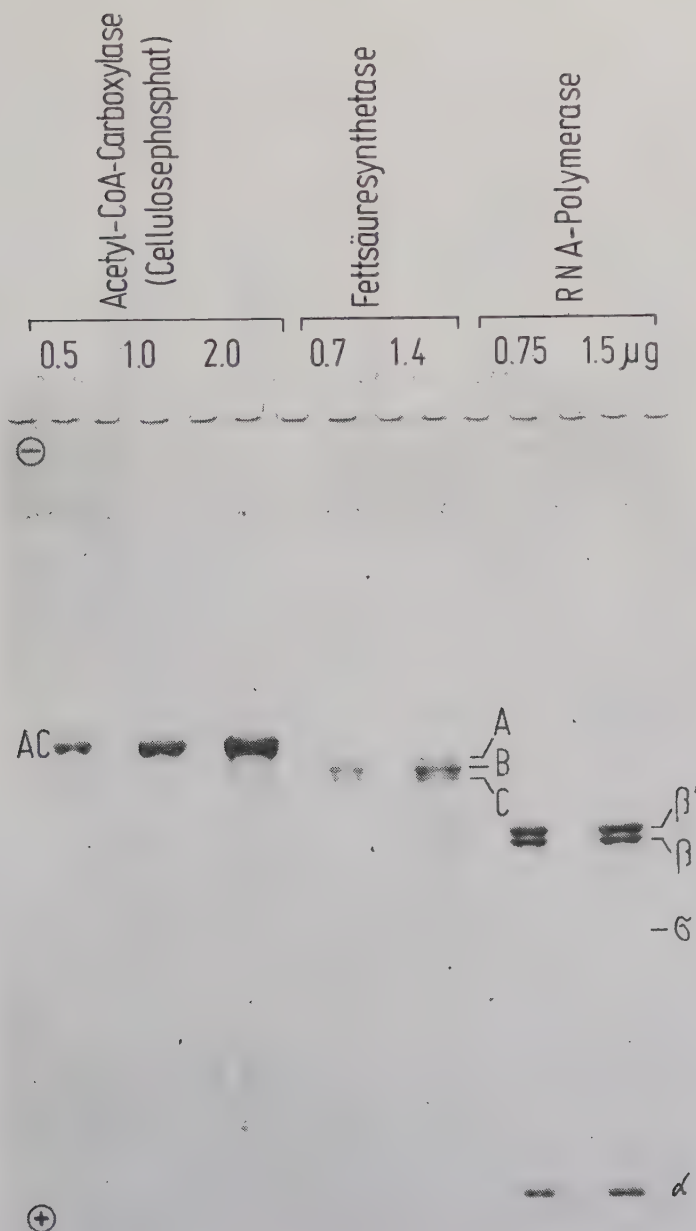


Abb. 4 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von Acetyl-CoA-Carboxylase und Markerproteinen

Die Elektrophorese wird im Plattengel mit einem linearen Gradienten von 5-15 % Acrylamid in Anodenrichtung (von oben nach unten) und einem Obergel (3 % Acrylamid) 15 h bei 125 V und < 25 mA bei +2°C durchgeführt. Die aufgetragenen Proben und Probenmengen sind bei den Auftragsflächen angegeben. SDS-Spaltung erfolgt bei 75°C (5 min) in 8 M Harnstoff, 5 % (w/v) Thioglykol (± 0.64 M), 2 % SDS. Näheres s. Text.

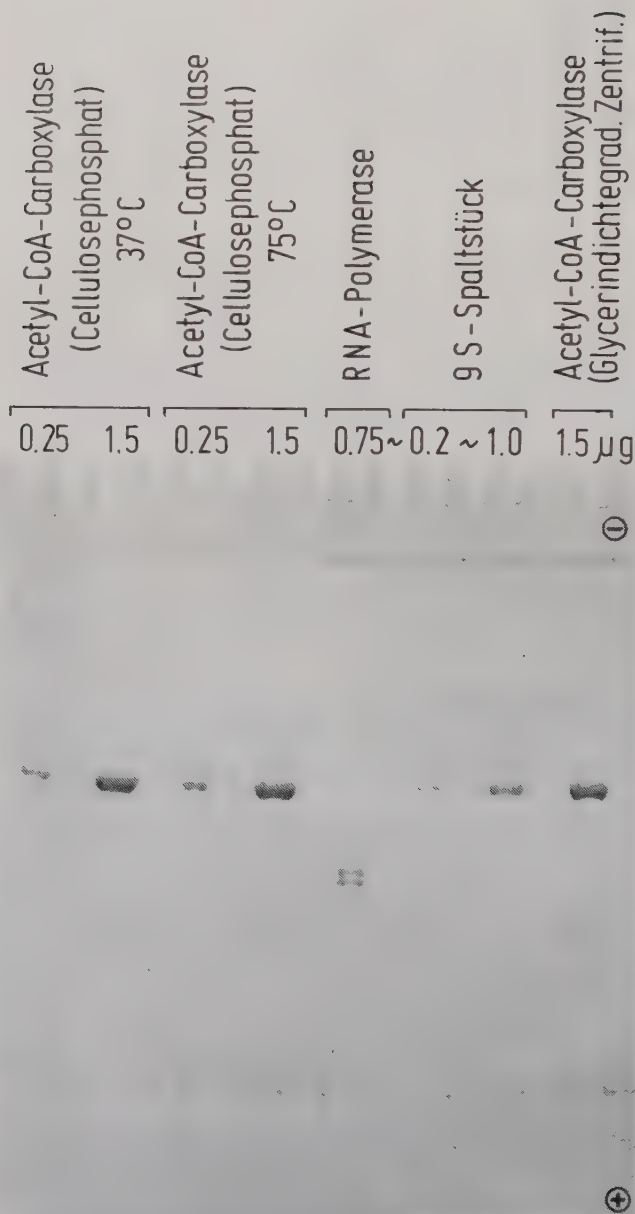


Abb. 5 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von Acetyl-CoA-Carboxylase nach unterschiedlicher Vorbehandlung

Die Bedingungen der Elektrophorese sind unter Abb. 4 angegeben. Die SDS-Spaltung von Acetyl-CoA-Carboxylase der Phosphocellulose-Fraktion erfolgt bei 37°C (15 min) oder 75°C (5 min). Alle übrigen Präparationen werden bei 75°C (5 min) gespalten. Näheres s. Text.

acrylamidgel-Elektrophorese ein Spaltmuster, in dem eine der drei wenig intensiven Banden fehlt (Abb. 5).

Ein noch wirksamerer Reinigungsschritt wurde gefunden, als die in alkalischem Medium gebildeten Spaltprodukte von Acetyl-CoA-Carboxylase in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese untersucht wurden.

Nach Sumper und Riepertinger (17) entstehen aus Acetyl-CoA-Carboxylase in alkalischem Medium vor allem Spaltprodukte mit den Sedimentationskoeffizienten 12 S, 9 S und 6 S.

Abb. 6 zeigt die Reproduktion dieses Ergebnisses. Nach Dialyse von Acetyl-CoA-Carboxylase der Phosphocellulose-Fraktion gegen 0.1 M

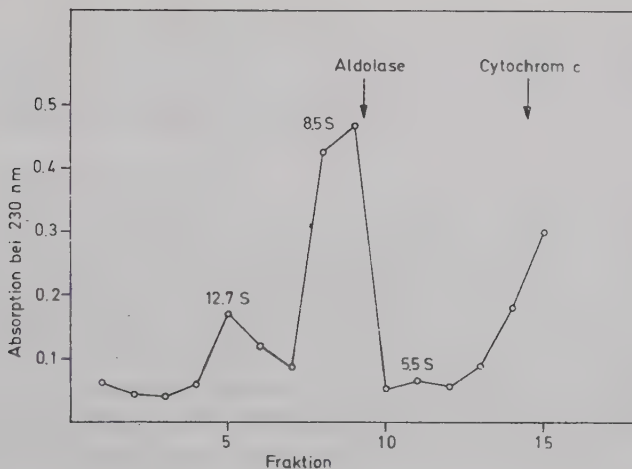


Abb. 6 Rohruckerdichtegradienten-Zentrifugation von dissoziierter Acetyl-CoA-Carboxylase

0.4 mg Acetyl-CoA-Carboxylase der Phosphocellulose-Fraktion werden 27 h bei 0°C gegen 0.1 M NH_3 , 0.01 M Thioglykol dialysiert. Die Enzymlösung wird anschließend auf einen linearen Rohruckerdichtegradienten (5-20 %) in 0.1 M Tris-HCl-Puffer, $\text{pH} = 9.0$, aufgetragen und 16.5 h bei +5°C und 39 000 Upm (SW 40 Rotor, L2-65 B-Ultrazentrifuge von Beckman) zentrifugiert. Marker werden getrennt zentrifugiert. Fraktionierung erfolgt vom Boden.

NH_3 , 0.01 M Thioglykol treten in der Rohrzuckerdichtegradienten-Zentrifugation Produkte auf, deren Sedimentationskoeffizienten nur wenig von den nach Sumper und Riepertinger (17) zu erwartenden Werten abweichen. Die Sedimentationskoeffizienten wurden nach Martin und Ames (29) berechnet.

Da die 9 S- und 12 S-Spaltstücke nach Sumper und Riepertinger (17) das Dimere, beziehungsweise Trimere der 6 S-Untereinheit darstellen, sollten alle Spaltstücke in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese das gleiche Spaltmuster aufweisen. Für die 6 S-Untereinheit konnte diese Forderung nicht nachgeprüft werden, da die Proteinkonzentration in den entsprechenden Fraktionen zu klein war. Mit den 9 S- und 12 S-Spaltstücken wurde eine einzige Bande gefunden, deren Position mit derjenigen des SDS-Spaltproduktes des nativen Enzyms übereinstimmt.

Abb. 5 zeigt das Ergebnis einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von etwa 1 μg Protein aus einer durch Polyäthylenglykolfällung konzentrierten Lösung von 9 S-Spaltstück. Die drei schwach angefärbten Banden, die bei der SDS-Elektrophorese der Phosphocellulose-Fraktion auftreten, sind unter diesen Versuchsbedingungen verschwunden.

Mit Hilfe der RNA-Polymerase-Untereinheiten β' und β , sowie der A-, B- und C-Komponenten der Fettsäuresynthetase wird das Molekulargewicht des SDS-Spaltproduktes der Acetyl-CoA-Carboxylase nach Shapiro et al. (26) und Weber und Osborn (27) bestimmt (Abb. 7). Für das Molekulargewicht der RNA-Polymerase-Untereinheiten β' und β wurden 160 000 und 155 000 angesetzt (30). Die Fettsäuresynthetase-Komponenten A, B und C haben Molekulargewichte von 185 000, 179 000 und 176 000 (13). Die Auswertung von 5 Versuchen führt zu einem Mittelwert von 189 000 mit einer mittleren Abweichung von ± 1530 ($\pm 0.8 \%$).

Versuche mit homogenen zylindrischen Gelen nach Weber und Osborn (27) ergeben den gleichen Mittelwert bei größerer mittlerer Abweichung.

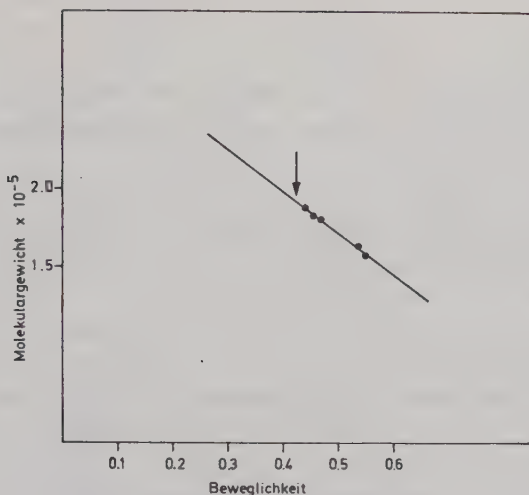


Abb. 7 Molekulargewicht als Funktion der Beweglichkeit

Die Molekulargewichte der Hefe-Fettsäuresynthetase-Komponenten A, B und C, sowie der RNA-Polymerase-Untereinheiten β' und β aus *E.coli* werden gegen die in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Abb. 4) bestimmten Beweglichkeiten halblogarithmisch dargestellt.

Der Pfeil gibt Beweglichkeit und Molekulargewicht des Spaltprodukts der Acetyl-CoA-Carboxylase an.

Die bisher dargestellten Ergebnisse der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen weisen darauf hin, daß Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase aus Polypeptidketten des Molekulargewichts 190 000 aufgebaut wird. Es bleibt vor allem die Frage offen, ob es sich um identische Polypeptidketten handelt. Um diese Frage beantworten zu können, sind weitere proteinchemische Untersuchungen erforderlich.

C. Aminosäureanalyse von Acetyl-CoA-Carboxylase

An den Anfang weiterer proteinchemischer Untersuchungen wird die Aminosäureanalyse von Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase gestellt. Diese Analyse wird mit Acetyl-CoA-Carboxylase der Phosphocellulose-Fraktion nach weiterer Reinigung durch Glycerindichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt.

Die meisten häufig auftretenden Aminosäuren werden bestimmt, nachdem das Enzym mit einem großen Überschuß von 6 N HCl, 0.1 % (v/v) Thioglykol und 0.1 % Phenol 24, 48 und 72 Stunden bei 106°C hydrolysiert wurde. Die Hydrolysemethode berücksichtigt Vorschläge von Hare (31), Blackburn (32), sowie Tristram und Smith (33). Aminosäureverluste werden nach Blackburn (32) durch Extrapolation der nach den verschiedenen Zeiten gefundenen Werte auf den Hydrolysebeginn korrigiert. Der mittlere relative Fehler der durch Extrapolation erhaltenen Werte beträgt ± 3 %. Er schwankt zwischen ± 6 % und ± 1 %. Der maximale relative Fehler der Einzelbestimmung mit dem Aminosäureanalysator liegt bei ± 3 %. Asparagin und Glutamin werden zu Asparaginsäure, beziehungsweise Glutaminsäure hydrolysiert und als solche bestimmt.

Zur Tryptophanbestimmung wird Acetyl-CoA-Carboxylase mit p-Toluolsulfonsäure nach Liu (34) oder mit Methansulfonsäure nach Moore (35) hydrolysiert. Wie Wiederfinderversuche zeigen, liegt der Tryptophan-Verlust in den beiden Verfahren unter 10 %.

Cystein wird nach Oxidation des Enzyms mit Perameisensäure und anschließender HCl-Hydrolyse als Cysteinsäure nach Hirs (36) bestimmt. In Experimenten mit Cystein wurden 83 % des eingesetzten Cysteins als Cysteinsäure nachgewiesen. Die mit Acetyl-CoA-Carboxylase gefundenen Werte wurden entsprechend korrigiert. Hierbei wird vorausgesetzt, daß freies und proteingebundenes Cystein mit derselben Ausbeute durch Perameisensäure zu Cysteinsäure oxidiert werden.

Weitere methodische Einzelheiten sind dem Experimentalteil zu entnehmen.

In Tab. 2 sind die Aminosäuremengen als Äquivalente einer Acetyl-CoA-Carboxylase-Untereinheit vom Molekulargewicht 189 000 angegeben.

Tab.2 Aminosäurezusammensetzung der Acetyl-CoA-Carboxylase-Untereinheit vom Molekulargewicht 190 000

Die Aminosäureanalyse erfolgt nach 24,48 und 72 h Hydrolyse mit 6 N HCl, 0.1 % (v/v) Thioglykol und 0.1 % Phenol. Die erhaltenen Werte werden auf den Hydrolysebeginn extrapoliert. Cystein wird als Cysteinsäure bestimmt. Tryptophan wird nach Hydrolyse mit 3 N p-Toluolsulfonsäure, 0.2 % Tryptamin oder mit 4 N Methansulfonsäure, 0.2 % Tryptamin bestimmt. Näheres s. Text.

Aminosäure	mol/1.9 10 ⁵ g
Asparaginsäure	164
Threonin	78
Serin	110
Glutaminsäure	190
Prolin	72
Glycin	115
Alanin	110
Cystein	15
Valin	110
Methionin	50
Isoleucin	113
Leucin	154
Tyrosin	55
Phenylalanin	70
Lysin	105
Histidin	45
Tryptophan	18
Arginin	97

Bei einem Vergleich der Aminosäurezusammensetzung von Fettsäuresynthetase (37) und Acetyl-CoA-Carboxylase (Tab. 2) aus Bierhefe stellt sich heraus, daß beide Multienzymkomplexe aus Bierhefe in ihren relativen Aminosäuregehalten weitgehend übereinstimmen.

D. Endgruppenbestimmungen von Acetyl-CoA-Carboxylase

Die Ergebnisse der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurden als Hinweis aufgefaßt, daß Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase aus Polypeptidketten des Molekulargewichts 190 000 besteht. Die Frage, ob es sich um identische Polypeptidketten handelt, soll durch Endgruppenbestimmungen weiter untersucht werden.

Die Bestimmung von N-terminalen Aminosäuren wird mit der Dansylchlorid-Methode nach Gray (38) und Hartley (39) durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß nucleophile Gruppen von Peptiden und Polypeptiden mit nicht-fluoreszierendem 1-Dimethyl-aminonaphthalin-5-sulfonylchlorid (Dansylchlorid) sulfonyliert werden. Nach kovalenter Verknüpfung mit den nucleophilen Gruppen tritt eine intensive gelbe Fluoreszenz auf (40). Die gebildeten Sulfonamidbindungen und die Esterbindung der phenolischen Trypsinhydroxylgruppe sind säurestabil, so daß nach der Proteinhydrolyse ϵ -N-Dansyllysine, O-Dansyltyrosine und die N-terminalen N-Dansylaminosäuren freigesetzt werden (38,41). Eine Ausnahme stellt N-Dansyltryptophan dar, das unter den Bedingungen der Proteinhydrolyse zerstört wird (38). Die dansylierten Aminosäuren können anschließend chromatographisch oder papierelektrophoretisch identifiziert werden (38). Nach Gray (38) liegt die Nachweisempfindlichkeit der chromatographischen Methode mit Polyamidblättern nach Woods und Wang (42) bei weniger als 0.1 nmol.

Das Verfahren, das Gray (38) zur Dansylierung von Proteinen vorschlägt, wurde mit geringen Änderungen übernommen und auf 0.5 bis 1.0 nmol Acetyl-CoA-Carboxylase-Untereinheit vom Molekulargewicht 190 000 angewandt. Die Methode wird im Experimentalteil beschrieben.

Vor der Dansylierung wurde Acetyl-CoA-Carboxylase der Phosphocellulose-Fraktion durch Glycerindichtegradientenzentrifugation weiter gereinigt und in einigen Experimenten mit Perameisensäure oxidiert. Auch das isolierte 9 S-Aggregat wurde eingesetzt.

In allen Experimenten konnten nach Dansylierung und Hydrolyse chromatographisch mit Laufmitteln nach Hartley (39), Jörnvall (43)

und Gottlieb et al. (44) nur O-Dansyltyrosin und ϵ -N-Dansyllysine nachgewiesen werden. Ein freier N-Terminus wurde mit der Dansylchlorid-Methode nicht gefunden. Dies deutet darauf hin, daß entweder Tryptophan N-terminale Aminosäure ist oder daß der N-Terminus von Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase blockiert ist.

Für die Richtigkeit der Annahme, daß eine N-terminale Blockierung vorliegt, sprechen Ergebnisse von Verdauungsexperimenten mit der Exopeptidase Leucinaminopeptidase. Wenn Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase gegen Puffer aus 0.1 M Tris-HCl, 0.0025 M $MgCl_2$, pH = 8.6, dialysiert und anschließend mit Leucinaminopeptidase nach Light (45) behandelt wird, kann keine Aminosäure mit dem Aminosäureanalysator nachgewiesen werden. Unter denselben Versuchsbedingungen wird dagegen die N-terminale Aminosäure Histidin aus Schweine-Glukagon freigesetzt.

Daß Acetyl-CoA-Carboxylase unter den gewählten Bedingungen nicht durch Leucinaminopeptidase verdaut wird, beweist allerdings nicht die Blockierung des N-Terminus. Auch wenn die N-terminale Aminosäure für die Exopeptidase nicht erreichbar oder an Prolin gebunden sein sollte, würde das Ergebnis nach Light (45) erklärbar sein.

Da es nicht gelungen ist, den N-Terminus von Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase zu bestimmen, wird versucht, den C-Terminus mit dem Carboxypeptidasen A und B nach Harris (46), Neurath (47) und Ambler (48) nachzuweisen.

Carboxypeptidasen setzen C-terminale Aminosäuren aus offenen Polypeptid- oder Peptidketten mit unterschiedlicher Substratspezifität frei (48). Während Carboxypeptidase A (CPA) besonders rasch Aminosäuren mit aromatischen und großen aliphatischen Seitenketten abspaltet, setzt Carboxypeptidase B (CPB) die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin schneller als andere Aminosäuren frei (48). Keine der beiden Carboxypeptidasen spaltet Prolin ab (48). Aus dem zeitlichen Verlauf der Aminosäurefreisetzung kann häufig die C-terminale Sequenz der untersuchten Polypeptidkette entnommen werden. Enthält die Proteinmischung zwei verschiedene Polypeptidketten, sind eindeutige Interpretationen schwierig.

Vor quantitativen Experimenten ist es notwendig, die jeweils optimalen Verdauungsbedingungen zu bestimmen. Tab. 3 faßt die wichtigsten Versuche zusammen, die mit Acetyl-CoA-Carboxylase der Phosphocellulose-Fraktion und Glukagon als Modellsubstrat durchgeführt wurden. In der Tabelle sind die Vorbereitung der Substrate Acetyl-CoA-Carboxylase und Glukagon, die Verdauungsbedingungen und die freigesetzten Aminosäuren aufgeführt.

Die Aminosäureanalyse erfolgte in einem Aminosäureanalysator unter Verwendung von Natriumcitrat- oder Lithiumcitrat-Puffern. Serin, Asparagin und Glutamin werden von der Kationenaustauscher-Säule des Aminosäureanalysators durch Natriumcitratpuffer gemeinsam mit der Retentionszeit von Serin eluiert. Verwendet man Lithiumcitratpuffer nach Benson et al. (49) werden die drei Aminosäuren getrennt eluiert.

Carboxypeptidase B setzt aus nicht vorbehandelter Acetyl-CoA-Carboxylase nach 36 Stunden Inkubation bei 23°C Lysin, Spuren von Arginin, Leucin und "Serin" frei (Tab. 3, Nr. 1). Unter denselben Bedingungen werden aus Glukagon die letzten 8 Aminosäuren mit einer Ausbeute von etwa 80 % abgespalten. Asparaginsäure in Position 16 wird nicht freigesetzt. Glukagon kann somit in guter Ausbeute durch Behandlung mit Carboxypeptidase B modifiziert werden.

Harris (46) und Ambler (48) empfehlen, Proteine vor der Verdauung zu denaturieren. Die C-terminalen Aminosäuren sind nach Protein-denaturierung mit größerer Wahrscheinlichkeit für Carboxypeptidasen erreichbar.

Besonders wirksam erwies sich bei der Endgruppenbestimmung von DFP-vorbehandeltem Trypsin die Dialyse gegen 1 mM HCl bei +4°C (50).

Aus Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase werden nach 24 Stunden Dialyse gegen 1 mM HCl bei +2°C und anschließender Verdauung mit Carboxypeptidase A und B fast alle häufigen Aminosäuren außer Cystein und Tryptophan freigesetzt (Tab. 3, Nr. 2). Um dieses Ergebnis eindeutig interpretieren zu können, wurde Acetyl-CoA-Carboxylase nach

Tab. 3 Verdauung von Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase und Schweine-Glukagon durch Carboxypeptidase A und B

110 bis 180 µg Acetyl-CoA-Carboxylase (AC) der Phosphocellulose-Fraktion (± 0.6 bis 0.9 nmol AC-Untereinheit vom Molekulargewicht 190 000) und 4 bis 6 µg Glukagon vom Schwein (± 1.0 bis 1.5 nmol) werden bei 23°C mit Carboxypeptidase A und B (CPA, CPB) in 0.2 M N-Äthylmorpholinacetat inkubiert. Die Konzentration der AC-Untereinheit beträgt 5.3 bis 9.0 µM, die Glukagonkonzentration 9.6 bis 14.3 µM. Die Reaktion wird durch Essigsäure-Zusatz (Endkonzentration 10 % v/v) beendet. Nach Zentrifugation (5 min bei 10⁴ g) werden die Aminosäuren in den Überständen bestimmt. Weitere Einzelheiten werden in der Tabelle angegeben. Experimentelle Einzelheiten s. Experimentalteil.

Nr.	Versuchsbedingungen	freigesetzte Aminosäuren aus Acetyl-CoA- Carboxylase
1	<u>Vorbereitung des Substrats:</u> keine Vorbehandlung <u>Verdauung:</u> 36 h bei pH = 8.5 mit 0.017 nmol CPB (50 mE), 0.6 nmol AC-Untereinheit	Lys, in Spuren: Thr,"Ser",Val, Arg, Leu,"Ser" Met,Leu,Phe, Trp
2	<u>Vorbereitung des Substrats:</u> Dialyse gegen 1 mM HCl (24 h, +2°C), dann Dialyse gegen 0.2 M N-Äthylmorpho- linacetat, pH = 8.5 (20 h, +2°C), Glukagon wird nicht vorbehandelt. <u>Verdauung:</u> 29 h bei pH = 8.5 mit 0.09 nmol CPA und 0.017 nmol CPB (50 mE), 0.9 nmol AC-Untereinheit	Asp, Thr,"Ser", Asp,Thr,"Ser", Glu,Gly,Ala, Ala,Val,Met, Val,Met,Ileu, Leu,Tyr,Phe, Leu,Tyr,Phe, Lys,Arg,Trp Lys,His,Arg
3	<u>Vorbereitung des Substrats:</u> Hitzenaturierung in 0.056 % SDS, 0.2 M N-Äthylmorpholin- acetat, pH = 8.5 (5 min, 75°C) <u>Verdauung:</u> 28 h in 0.056 % SDS bei pH = 8.5 mit 0.09 nmol CPA und 0.034 nmol CPB (100 mE), 0.6 nmol AC-Untereinheit	Lys,Leu, Asp,Thr,Asn, in Spuren: Gln,Ala,Val, Val,Met,Ileu, Met,Leu,Tyr, Tyr,Phe Phe,Lys,Trp, Arg
4	<u>Vorbereitung des Substrats:</u> Hitzenaturierung in 0.056 % SDS, 0.2 M N-Äthyl- morpholinacetat, pH = 8.5 (5 min, 80°C) <u>Verdauung:</u> 18 h in 0.056 % SDS bei pH = 8.5 mit 0.034 nmol CPB (100 mE), 0.6 nmol AC-Untereinheit	Lys,Leu in Spuren: Thr,Val,Met Leu
5	<u>Vorbereitung des Substrats:</u> wie bei Nr. 4, aber bei pH = 9.2 <u>Verdauung:</u> 18 h in 0.056 % SDS bei pH = 9.2 mit 0.09 nmol CPA, 0.6 nmol AC-Untereinheit	- Thr,Asn,Gln, Ala,Val,Met, Leu,Phe
6	<u>Vorbereitung des Substrats:</u> Denaturierung in 6 M Harn- stoff, 0.2 M N-Äthylmor- pholinacetat, pH = 8.5 (1 h, 37°C) <u>Verdauung:</u> 25 h in 6 M Harnstoff bei pH = 8.5 mit 0.09 nmol CPA, 0.9 nmol AC-Untereinheit	- Thr,"Ser",Val, Met,Leu,Phe

der Dialyse gegen HCl in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese untersucht. Abb. 8 zeigt als Ergebnis eine Aufspaltung des Enzyms in viele Proteinbanden.

Daß Proteaseaktivitäten in den Acetyl-CoA-Carboxylase-Präparationen für diese Aufspaltung verantwortlich sein könnten, ist von vorneherein unwahrscheinlich, da pH- und Temperaturbedingungen während der Dialyse für die Proteolyse durch Proteasen ungünstig erscheinen. Um die Möglichkeit von Proteasewirkungen weitgehend auszuschließen, wird Acetyl-CoA-Carboxylase der Phosphocellulose-Fraktion mit 0.06 % SDS bei pH = 8.5 und 23°C 18 Stunden aufbewahrt. Die anschließende SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese weist nur eine Bande auf, die dem Molekulargewicht 190 000 entspricht. Demnach ist es sehr unwahrscheinlich, daß die Phosphocellulose-Fraktion aktive Proteasen enthält.

Als wahrscheinliche Erklärung für die Aufspaltungen nach Dialyse gegen 1 mM HCl bleibt die Annahme einer partiellen Hydrolyse durch HCl. Daß diese Annahme berechtigt ist, zeigt auch das Ergebnis der Aminosäureanalyse des Dialysats nach dem ersten Wechsel der HCl-Lösung. Das Dialysat enthält mit Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glycin und Alanin Aminosäuren, die nach McDowall und Smith (51) bei partiellen Hydrolysen mit HCl als erste freigesetzt werden. Nach diesen Ergebnissen ist somit die Vorbehandlung von Acetyl-CoA-Carboxylase mit HCl vor der Inkubation mit Carboxypeptidasen eine ungeeignete Denaturierungsmethode, da aus der Aminosäurefreisetzung nicht auf die C-terminale Aminosäuresequenz von Acetyl-CoA-Carboxylase geschlossen werden darf.

Als günstig erwies sich dagegen eine von Neurath (52) vorgeschlagene Hitzedenaturierung. Da Acetyl-CoA-Carboxylase nach kurzzeitigem Erhitzen auf 80°C häufig koaguliert, wird in Gegenwart von 0.06 % SDS gearbeitet. Durch diesen SDS-Zusatz geht koaguliertes Protein beim Abkühlen auf Raumtemperatur wieder vollständig in Lösung. Die erhaltene Proteinlösung wird anschließend mit Carboxypeptidase bei Raumtemperatur inkubiert. Der SDS-Zusatz führt zu einer Aktivitätsabnahme der Carboxypeptidasen von etwa 10 %. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen zeigen, daß die beschriebene Methode der Hitze-

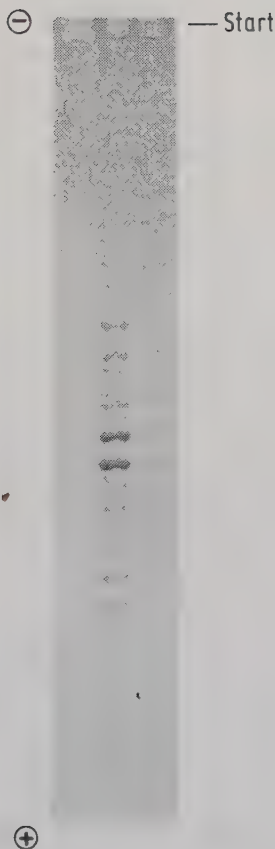


Abb. 8 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von Acetyl-CoA-Carboxylase nach Dialyse gegen 1 mM HCl

0.9 mg Acetyl-CoA-Carboxylase der Phosphocellulose-Fraktion werden 24 h bei +2°C gegen 1 mM HCl und anschließend 20 h bei +2°C gegen 0.2 M N-Äthylmorpholinacetat, pH = 8.5, dialysiert (s. Tab. 3, Nr. 2). Nach SDS-Spaltung (s. Experimentalteil) werden 1 bis 3 µg Protein im Plattengel einer Elektrophorese unterworfen (Bedingungen der Elektrophorese: s. unter Abb. 4).

denaturierung nicht zu Proteinspaltungen führt.

Tab. 3 ist zu entnehmen, daß aus hitzedenaturierter Acetyl-CoA-Carboxylase nur in Gegenwart von Carboxypeptidase B Aminosäuren und zwar vor allem Lysin und Leucin freigesetzt werden.

Durch Carboxypeptidase A wird auch dann keine Aminosäure aus hitzedenaturierter Acetyl-CoA-Carboxylase abgespalten, wenn der pH-Wert von 8.5 auf 9.2 erhöht wird. Eine solche Erhöhung des pH-Wertes sollte nach Ambler (48) die Freisetzung der basischen Aminosäuren, besonders die von Histidin (53) erleichtern.

Daß hitzedenaturiertes Glukagon in Gegenwart von 0.06 % SDS durch Carboxypeptidase B in 18 Stunden kaum verdaut wird (Tab. 3, Nr. 4), ist auf die Substratspezifität von Carboxypeptidase B zurückzuführen. Unter denselben Bedingungen werden aus Lysozym die C-terminalen Aminosäuren Leucin und Arginin freigesetzt. Das C-terminale Threonin von Glukagon wird also erst nach sehr langer Inkubation mit Carboxypeptidase B abgespalten (Tab. 3, Nr. 1).

Auch wenn Acetyl-CoA-Carboxylase 1 Stunde in 6 M Harnstoff bei 37°C denaturiert und anschließend 25 Stunden bei 23°C mit Carboxypeptidase A inkubiert wird, ist keine Aminosäurefreisetzung nachzuweisen (Tab. 3, Nr. 6).

Nach diesen Experimenten ist es sehr unwahrscheinlich, daß Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase eine C-terminale Aminosäure enthält, die ein "CPA-Substrat" darstellt. Daß Lysin und Leucin in Verdauungsversuchen mit Carboxypeptidase B freigesetzt werden, weist auf Lysin als einzige C-terminale Endgruppe hin.

Eine eindeutige Interpretation ist deswegen unmöglich, weil Carboxypeptidase B im Gegensatz zu Carboxypeptidase A nachweisbare Endopeptidaseaktivität enthält. Nach 18 Stunden Inkubation von hitzedenaturierter Acetyl-CoA-Carboxylase mit Carboxypeptidase B findet man in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese zahlreiche Proteinbanden (Abb. 9). Die Zahl der Banden und ihre Intensität

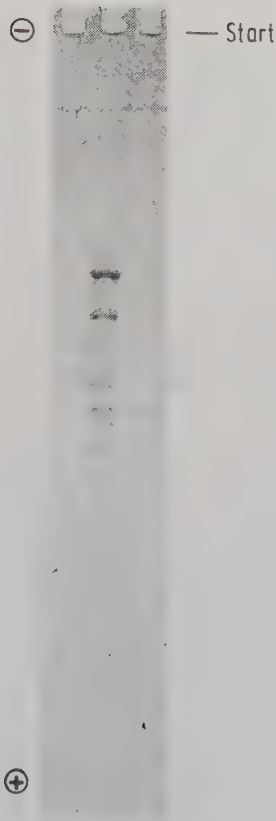


Abb. 9 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von Acetyl-CoA-Carboxylase nach Inkubation mit Carboxypeptidase B

Der Rückstand des Verdauungsansatzes Nr. 4, Tab. 3 wird mit SDS gespalten (s. Experimentalkteil). Etwa 1.5 µg Protein werden im Plattengel einer Elektrophorese unterworfen. (Bedingungen der Elektrophorese: s. unter Abb. 4).

nimmt bei noch längerer Inkubationszeit weiter zu. In Kontrollversuchen ohne Carboxypeptidase B tritt nur eine Bande auf, die einem Molekulargewicht von 190 000 entspricht.

Nach diesen elektrophoretischen Ergebnissen ist es nicht möglich, eindeutig aus der Aminosäurefreisetzung in Verdauungsexperimenten

mit Carboxypeptidase B auf die C-terminale Sequenz von Acetyl-CoA-Carboxylase zu schließen.

Diese Schwierigkeiten lassen sich durch Experimente überwinden, in denen die Zeitabhängigkeit der Aminosäurefreisetzung untersucht wird. Dazu werden 0.6 mg Acetyl-CoA-Carboxylase der Phosphocellulose-Fraktion in 0.06 % SDS hitzedenaturiert und anschließend mit 2650 mE Carboxypeptidase B bei 23°C inkubiert. Die eingesetzte Acetyl-CoA-Carboxylase-Menge entspricht 3.4 nmol Acetyl-CoA-Carboxylase-Untereinheit vom Molekulargewicht 190 000. Nach definierten Zeitintervallen werden dem Inkubationsansatz Aliquote entnommen. Nach Beendigung der Reaktion durch Essigsäure-Zusatz und nach Zentrifugation werden die Rückstände in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese untersucht. Die Überstände werden nach Aminosäuren analysiert. Bei der Aminosäureanalyse werden Lithiumcitratpuffer eingesetzt, um Asparagin, Glutamin und Serin getrennt eluieren zu können. Abb. 10 und Abb. 11 geben die Ergebnisse dieses Versuchs wieder. Die freigesetzten Aminosäuren werden auf die Acetyl-CoA-Carboxylase-Untereinheit vom Molekulargewicht 190 000 bezogen. Bereits nach 15 min sind 0.6 Äquivalente Lysin und 0.3 Äquivalente Leucin freigesetzt. In der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese sind nach dieser Inkubationszeit keine proteolytischen Spaltungen nachweisbar. Nachdem nach 60 min 1 Äquivalent Lysin und 0.8 Äquivalente Leucin abgespalten sind, erreichen beide Kurven ein Plateau. Daß dieses Plateau nicht auf eine Abnahme der Carboxypeptidase-Aktivität zurückgeführt werden kann, ist aus dem Wiederanstieg beider Kurven nach 90 min Inkubation abzuleiten.

Die SDS-Elektrophoresen (Abb. 11) zeigen nach 90 min und 120 min Inkubation mit Carboxypeptidase B eine zusätzliche Proteinbande. Dies weist auf einen proteolytischen Abbau von Acetyl-CoA-Carboxylase durch Endopeptidasen hin.

Dieses Experiment der zeitabhängigen Aminosäurefreisetzung wird als Beweis dafür aufgefaßt, daß Lysin den C-Terminus und -Leu-Lys die C-terminale Endsequenz von Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase darstellen.

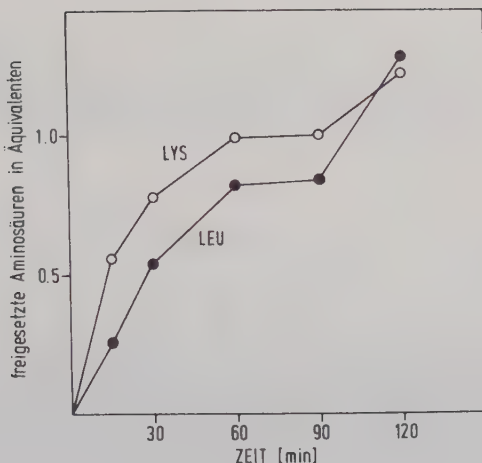


Abb. 10 Kinetik der Aminosäureabspaltung von Acetyl-CoA-Carboxylase durch Carboxypeptidase B

0.6 mg Acetyl-CoA-Carboxylase der Phosphocellulose-Fraktion (≈ 3.4 nmol Untereinheit vom Molekulargewicht 190 000) werden in Puffer aus 0.056 % SDS und 0.2 M N-Äthylmorpholinacetat, pH = 8.5, bei einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml durch Hitze (5 min, 80°C) denaturiert und mit 2650 mE Carboxypeptidase B (Substrat: Enzym = 3.7:1) bei 23°C inkubiert. Nach den angegebenen Zeitintervallen werden Aliquote entnommen und mit 10 % (v/v) Essigsäure (Endkonzentration) versetzt. Nach Zentrifugation werden die Aminosäuren der Überstände mit dem Aminosäureanalysator bestimmt. (Zentrifugationsbedingungen: 5 min bei 10^4 g).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der SDS-Spaltungen und der Endgruppenbestimmungen, daß Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase aus Polypeptidketten des Molekulargewichts 190 000 und der C-terminalen Endsequenz -Leu-Lys gebildet wird.

Acetyl-CoA-Carboxylase
(Cellulosephosphatfraktion)

RNA-Polymerase

Dauer der Inkubation von Acetyl-CoA-Carboxylase mit Carboxypeptidase B

0 15 30 60 90 120 min

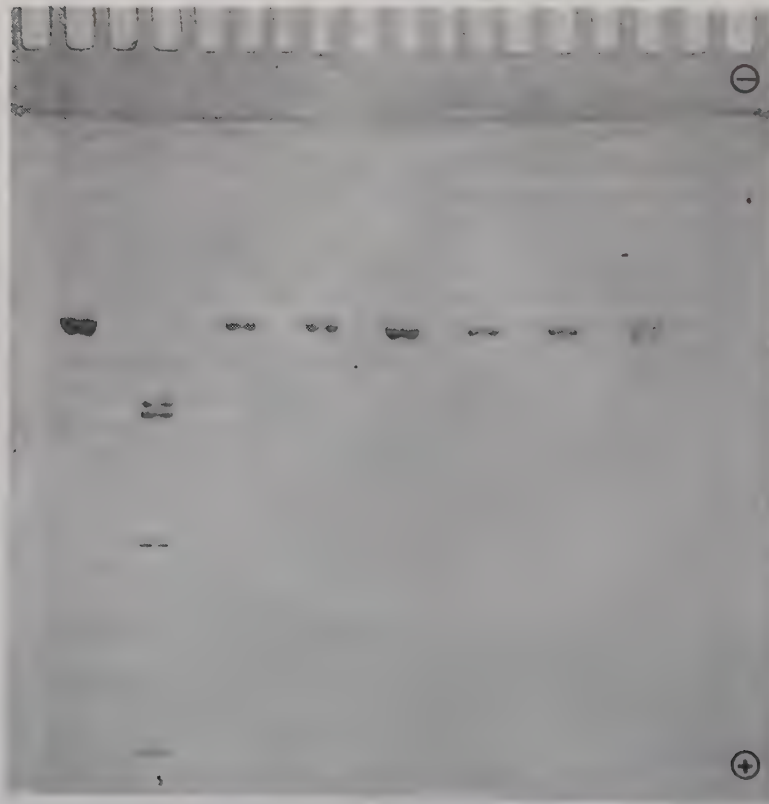


Abb. 11 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von Acetyl-CoA-Carboxylase nach Inkubation mit Carboxypeptidase B

Die Bedingungen der Carboxypeptidase B-Verdauung sind unter Abb. 10 beschrieben. Die Rückstände der Verdauungsproben nach Essigsäure-Fällung und Zentrifugation wurden in der SDS-Elektrophorese im Plattengel (Versuchsbedingungen s. Abb. 4) untersucht. Die angegebenen Zeiten entsprechen der Inkubationsdauer mit Carboxypeptidase B. Von allen Proben wurden etwa 1.5 µg Protein aufgetragen.

E. Untersuchung der Inaktivierung und Reaktivierung von Acetyl-CoA-Carboxylase

Die Dissoziation von Acetyl-CoA-Carboxylase in ammoniakalischer Lösung ist nach Sumper et al. (16,17) mit Verlust der Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivität verbunden. Diese Inaktivierung wurde genauer untersucht.

Da es bisher in keinem Experiment gelungen ist, Acetyl-CoA-Carboxylase nach Dialyse gegen NH_3 zu reaktivieren, wurde der zeitliche Verlauf der NH_3 -Inaktivierung verfolgt, um unmittelbar nach völligem Verschwinden der Aktivität mit einem Reaktivierungsversuch beginnen zu können. Abb. 12 zeigt das Ergebnis eines solchen Versuchs.

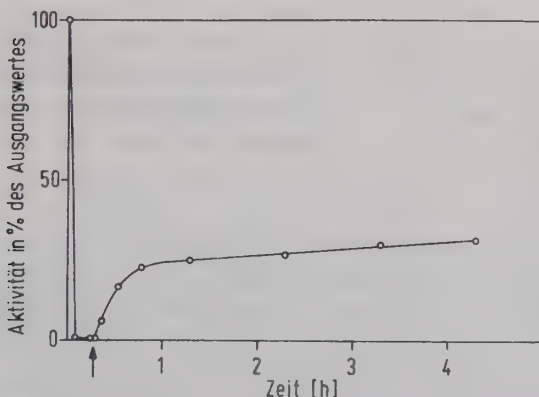


Abb. 12 Inaktivierung von Acetyl-CoA-Carboxylase in 0.1 M NH_3 und Reaktivierung durch Ansäuern mit Phosphatpuffer³
Acetyl-CoA-Carboxylase der Phosphocellulose-Fraktion (7 mg/ml in Puffer aus 0.3 M Kaliumphosphat, 50 % (v/v) Glycerin und 5 mM Dithiothreitol, pH = 6.5) wird bei 0°C 1:25 mit 0.1 M NH_3 , 20 mM Dithiothreitol verdünnt. Zu dem durch den Pfeil gegebenen Zeitpunkt wird die Enzym-lösung 1:2 mit 1 M Kaliumphosphat, 20 mM Dithiothreitol, pH = 6.5, verdünnt und auf 25°C erwärmt. Der zeitliche Verlauf der Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivität wird dargestellt.

Acetyl-CoA-Carboxylase der Phosphocellulose-Fraktion wird 1:25 mit 0.1 M NH_3 , 20 mM Dithiothreitol bei 0°C zu einer Proteinkonzentration

von 0.3 mg/ml verdünnt und anschließend bei 0°C aufbewahrt. Bereits nach 5 min ist keine Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivität mehr nachweisbar. Nach 1:2 Verdünnung mit 1 M Kaliumphosphat, 20 mM Dithiothreitol, pH = 6.5, und Erwärmen auf 25°C tritt eine Reaktivierung ein, die nach 4 Stunden 31 % des Ausgangswertes erreicht und auch nach längerer Zeit nur noch unwesentlich steigt. Durch den Phosphatzusatz sinkt der pH-Wert von 11 auf 6.5.

Da Acetyl-CoA-Carboxylase reaktiviert werden kann, ist es unmöglich, den Aktivitätsverlust in ammoniakalischer Lösung allein auf irreversible Denaturierung zurückzuführen. Es wird geschlußfolgert, daß der intakte tetramere Komplex erforderlich ist, um die Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivität zu erhalten.

Unklar bleibt, ob dies auch auf die Acetyl-CoA-Carboxylase-Teilaktivitäten zutrifft. Bisher wurde nur die Biotincarboxylase-Aktivität gemessen. Die Bestimmung dieser Teilaktivität erfolgt mit dem ATP-ADP-Austauschtest nach Lynen et al. (54), der so verändert wurde, daß Anfangsreaktionsraten gemessen werden können. Das Prinzip des Tests soll mit Hilfe von Abb. 1 (S. 1) erläutert werden. Gibt man Acetyl-CoA-Carboxylase zu einer Lösung aus ATP, HCO_3^- , Mg^{2+} , ^{14}C -ADP und Phosphat, so sollte sich Biotincarboxylase-Aktivität in der Bildung von ^{14}C -ATP äußern.

Nach Abb. 13 hängt die ^{14}C -ATP-Bildung linear von der Zeit und der eingesetzten Enzymmenge ab. Daß Biotin an dieser Reaktion beteiligt ist, wird durch die spezifische Avidinhemmung der ^{14}C -ATP-Bildung nachgewiesen. Avidin, ein Biotin komplexierendes Protein (55), hemmt den von Acetyl-CoA-Carboxylase katalysierten ATP-ADP-Austausch nur, wenn es nicht mit freiem Biotin vorinkubiert wird. Zusatz von Biotin allein beeinflusst die Austauschreaktion nur geringfügig. (Tab. 4).

Mit diesem ATP-ADP-Austauschtest wird die Biotincarboxylase-Aktivität von Acetyl-CoA-Carboxylase in ammoniakalischem Medium gemessen.

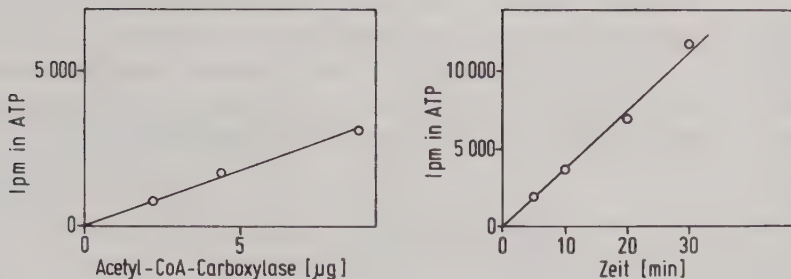


Abb. 13 Abhängigkeit der ^{14}C -ATP-Bildung beim ATP- ^{14}C -ADP-Austausch von Zeit und Enzymmenge

Die Abhängigkeit der ^{14}C -ATP-Bildung von der Enzymmenge im Testansatz wird erhalten, indem der ATP- ^{14}C -ADP-Austauschtest mit verschiedenen Proteinmengen der Phosphocellulose-Fraktion durchgeführt wird (5 min, 25°C). Einzelheiten des Tests werden im Experimenterteil beschrieben. Zur Bestimmung der Zeitabhängigkeit wird die Inkubationszeit eines größeren Testansatzes auf 30 min ausgedehnt. Nach definierten Zeitintervallen wird die ^{14}C -ATP-Bildung aus Aliquoten gemessen, die 5.6 µg Acetyl-CoA-Carboxylase enthalten.

Tab. 4 Hemmung der ATP- ^{14}C -ADP-Austauschreaktion durch Avidin.

Avidin, mit (+)-Biotin vorinkubiertes Avidin (15 min, 25°C) und (+)-Biotin werden mit Acetyl-CoA-Carboxylase der Phosphocellulose-Fraktion 30 min bei 25°C in 0.3 M Kaliumphosphat, 50 % (v/v) Glycerin und 5 mM Dithiothreitol, pH = 6.5, inkubiert. Konzentrationen im Inkubationsansatz: 0.32 mg Acetyl-CoA-Carboxylase/ml, 0.58 mg Avidin/ml (spezifische Avidin-Aktivität: 12.6 E/mg) und 0.45 mg (+)-Biotin/ml. Die Vorinkubation erfolgt mit doppelten Avidin- und (+)-Biotinkonzentrationen. Nach der Inkubation werden jeweils 10 µl der Lösungen (3 µg Enzym) im ATP-ADP-Austauschtest (Endvolumen 60 µl) eingesetzt. Nach 30 min Inkubation bei 25°C wird die Reaktion durch Zusatz von 6 µl Essigsäure beendet. Nach Zentrifugation (5 min bei 10^4 g) wird das gebildete ^{14}C -ATP aus 25 µl des Überstands bestimmt. Weitere Einzelheiten s. Experimenterteil.

Versuchsbedingungen	Ipm in ATP
Acetyl-CoA-Carboxylase	3061
Acetyl-CoA-Carboxylase + Avidin	0
Acetyl-CoA-Carboxylase + Avidin-Biotin	3662
Acetyl-CoA-Carboxylase + Biotin	3429

Wie Abb. 14 zeigt, verschwindet die Teilaktivität sehr rasch, wenn Acetyl-CoA-Carboxylase der Phosphocellulose-Fraktion mit 0.1 M NH_3 , 20 mM Dithiothreitol verdünnt wird. Demnach erfordert auch die Biotincarboxylase-Aktivität von Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase die intakte tetramere Struktur des Multienzymkomplexes.

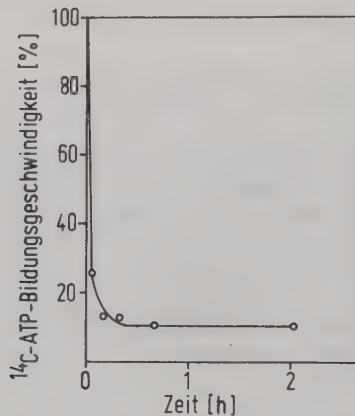


Abb. 14 Wirkung der Inkubation von Acetyl-CoA-Carboxylase in 0.1 M NH_3 auf den ATP- ^{14}C -ADP-Austausch

Acetyl-CoA-Carboxylase der Phosphocellulose-Fraktion (7 mg/ml in Puffer aus 0.3 M Kaliumphosphat, 50 % (v/v) Glycerin und 5 mM Dithiothreitol, pH = 6.5) wird bei 0°C 1:5 mit 0.1 M NH_3 , 20 mM Dithiothreitol verdünnt und anschließend bei 0°C inkubiert. Nach definierten Zeitintervallen werden jeweils 10 μl (= 9.4 μg Acetyl-CoA-Carboxylase) dieser Lösung im ATP- ^{14}C -ADP-Austauschtest (5 min, 25°C) eingesetzt. Die im gebildeten ^{14}C -ATP gefundenen Ipm werden in % des Ausgangswertes gegen die Zeit der Inkubation in 0.1 M NH_3 aufgetragen.

Da Acetyl-CoA-Carboxylase in 0.1 M NH_3 zum großen Teil irreversibel denaturiert wird, stellt die Behandlung mit NH_3 keine geeignete Methode dar, um die wesentlichen Parameter der reversiblen Inaktivierung genauer zu untersuchen. Als günstig erwies sich eine Versuchsanordnung, die auf Sumper und Riepertinger (17) zurückgeht. Sumper und Riepertinger (17) inaktivierten Acetyl-CoA-Carboxylase

in Tris-Puffer bei $\text{pH} = 8.5$ und 0°C und beobachteten nach Ansäuern auf $\text{pH} = 6.5$ und Zusatz von Glycerin und Dithiothreitol bei 0°C Reaktivierung, die nach 72 Stunden 46 % des Ausgangswertes erreichte. Diese Methode wurde auf Acetyl-CoA-Carboxylase der Phosphocellulose-Fraktion angewandt. Das Enzym wurde mit 0.1 M Tris-Puffer zu einer Proteinkonzentration von 0.08 mg/ml verdünnt und bei $\text{pH} = 8.5$ und 0°C aufbewahrt. Wie Abb. 15, Kurve II, zeigt, sinkt die Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivität innerhalb von 2 Stunden auf etwa 5 % des Ausgangswertes. Anschließender Zusatz eines gleichgroßen Volumens Puffer aus 1 M Kaliumphosphat, 10 mM Dithiothreitol und 20 % (v/v) Glycerin, $\text{pH} = 6.5$, führt bei 0°C und $\text{pH} = 6.5$ zu rascher Reaktivierung, die nach 21 Stunden bei 80 %

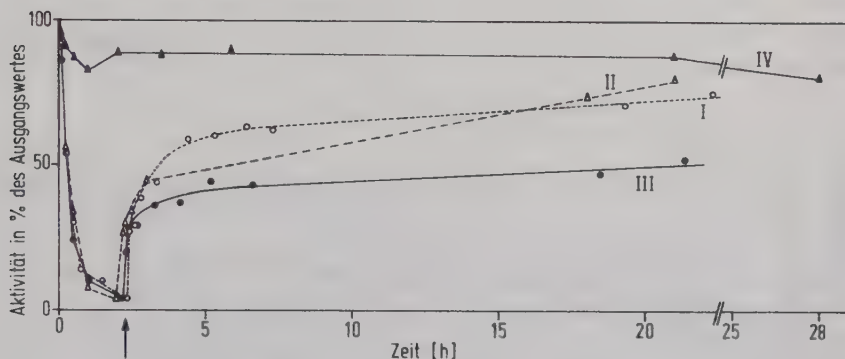


Abb. 15 Einfluß von Glycerin auf Inaktivierung und Reaktivierung von Acetyl-CoA-Carboxylase

Acetyl-CoA-Carboxylase der Phosphocellulose-Fraktion (4 mg/ml in Puffer aus 0.3 M Kaliumphosphat, 50 % (v/v) Glycerin und 5 mM Dithiothreitol, $\text{pH} = 6.5$) wird 1:25 mit glycerinfreiem (I, II, III) und glycerinhaltigem (IV) 0.1 M Tris-HCl, $\text{pH} = 8.5$ (0°C), verdünnt. Die Glycerinkonzentration beträgt 0.23 M (I, II, III) und 2.5 M (IV). Zu dem durch den Pfeil gegebenen Zeitpunkt wird ein gleichgroßes Volumen von 1 M Kaliumphosphat, 10 mM Dithiothreitol, $\text{pH} = 6.5$, zugesetzt. Die Mischung wird bei 0°C gehalten. Der Phosphatpuffer enthält verschiedene Glycerinkonzentrationen, so daß die Endkonzentration 0.12 M (I), 1.27 M (II) und 2.42 M (III) betragen. Es wird der zeitliche Verlauf der Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivität unter den verschiedenen Versuchsbedingungen dargestellt.

des Ausgangswertes liegt. Um den Einfluß von Glycerin zu bestimmen, erfolgt Inaktivierung und Reaktivierung von Acetyl-CoA-Carboxylase bei verschiedenen Glycerinkonzentrationen unter sonst übereinstimmenden Versuchsbedingungen. Wie Abb. 15 zu entnehmen ist, werden sowohl Inaktivierung als auch Reaktivierung durch Erhöhung der Glycerinkonzentration gehemmt.

Die Bedeutung des Dithiothreit-Zusatzes wird untersucht, indem alkalisch inaktivierte Acetyl-CoA-Carboxylase in Gegenwart und Abwesenheit von Dithiothreit reaktiviert wird. Während der zeitliche Verlauf der Reaktivierung nicht von Dithiothreit abhängt, wird in Gegenwart von Dithiothreit ein größerer Endwert erreicht (Abb. 16). Wahrscheinlich ist dieses Ergebnis darauf zurückzuführen, daß Dithiothreit durch reduktive Spaltung von Disulfidbrücken die Konzentration von reversibel inaktiviertem Enzym vergrößert.

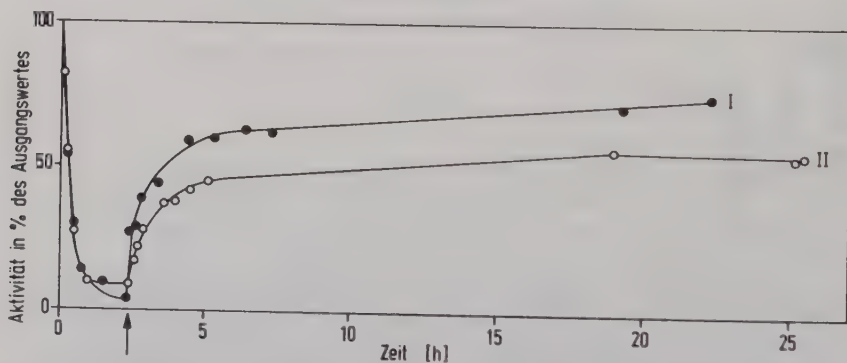


Abb. 16 Einfluß von Dithiothreit auf die Reaktivierung von Acetyl-CoA-Carboxylase

Acetyl-CoA-Carboxylase der Phosphocellulose-Fraktion (4 mg/ml in Puffer aus 0.3 M Kaliumphosphat, 50 % (v/v) Glycerin und 5 mM Dithiothreit, $\text{ph} = 6.5$) wird 1:25 mit 0.1 M Tris-HCl, $\text{ph} = 8.5$ (0°C), verdünnt und bei 0°C inkubiert. Zu dem durch den Pfeil gegebenen Zeitpunkt wird ein gleichgroßes Volumen von 1 M Kaliumphosphat-Puffer, $\text{ph} = 6.5$, mit und ohne 10 mM Dithiothreit zugesetzt. Die Kurven I und II zeigen den zeitlichen Verlauf der Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivität unter den verschiedenen Reaktivierungsbedingungen (I: mit Dithiothreit, II: ohne Dithiothreit) bei 0°C .

Die ph-Abhängigkeit der reversiblen Inaktivierung wird deutlich, wenn der ph-Wert im Reaktivierungsansatz bei $\text{ph} = 8.5$ gehalten und nicht auf $\text{ph} = 6.5$ gesenkt wird (Abb. 17). Es tritt zwar auch

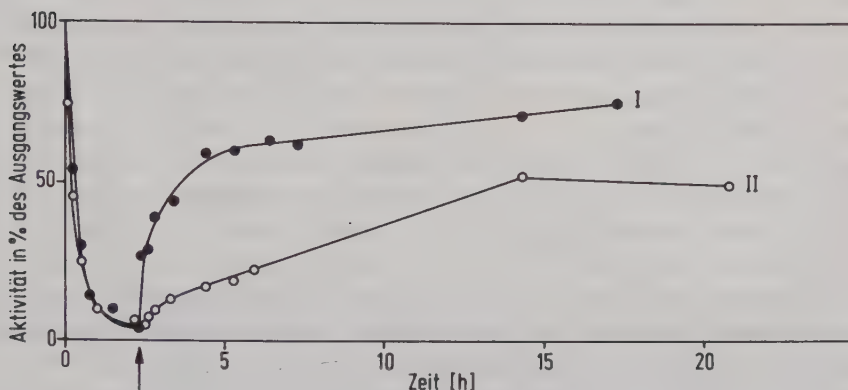


Abb. 17 Einfluß der ph-Änderung auf die Reaktivierung von Acetyl-CoA-Carboxylase

Acetyl-CoA-Carboxylase der Phosphocellulose-Fraktion (4 mg/ml in 0.3 M Kaliumphosphat, 50 % (v/v) Glycerin und 5 mM Dithiothreitol, $\text{ph} = 6.5$) wird 1:25 mit 0.1 M Tris-HCl, $\text{ph} = 8.5$ (0°C), verdünnt. Zu dem durch den Pfeil gegebenen Zeitpunkt wird ein gleichgroßes Volumen von Puffer aus 1 M Kaliumphosphat und 10 mM Dithiothreitol, $\text{ph} = 6.5$ (I) oder $\text{ph} = 8.5$ (II), zugesetzt. Die Kurven I und II zeigen den zeitlichen Verlauf der Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivität unter den verschiedenen Reaktivierungsbedingungen bei $\text{ph} = 6.5$ (I) und $\text{ph} = 8.5$ (II). Versuchstemperatur: 0°C .

bei $\text{ph} = 8.5$ unter den gegebenen Bedingungen Reaktivierung auf, die Geschwindigkeit dieser Reaktivierung und der erreichte Endwert sind aber eindeutig kleiner als im Vergleichsversuch, bei dem die Reaktivierung unter sonst gleichen Bedingungen bei $\text{ph} = 6.5$ erfolgt. Wahrscheinlich ist die bei $\text{ph} = 8.5$ zu beobachtende Reaktivierung (Abb. 17, Kurve II) auf die Erhöhung der Ionenstärke zu beziehen, die durch den Phosphatzusatz verursacht wird.

Die beschriebene Versuchsanordnung zur reversiblen Inaktivierung ist durch den Nachteil belastet, daß durch den Zusatz des Reakti-

vierungspuffers viele Parameter geändert werden. Eine Vereinfachung gelingt dadurch, daß Acetyl-CoA-Carboxylase in einem Medium aus 0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl und 10 mM Dithiothreitol bei 0°C und pH = 8.5 inaktiviert und anschließend durch Erwärmen auf 25°C wieder reaktiviert wird. Der Kochsalzzusatz erfolgt deswegen, weil durch ihn höhere Aktivitätswerte nach Erwärmen erreicht werden. Ein Beispiel für diese Versuchsanordnung ist in Abb. 18 wiedergegeben. Acetyl-CoA-Carboxylase der Phosphocellulose-Fraktion wird mit Puffer aus 0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl und 10 mM Dithiothreitol, pH = 8.5, verdünnt, so daß Proteinkonzentrationen von 0.04, 0.08 und 0.16 mg/ml resultieren. Die Enzymlösungen verlieren bei 0°C rasch ihre Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivität. Nach Erwärmen auf 25°C tritt Reaktivierung auf. Durch die Temperaturerhöhung von 0 auf 25°C wird der pH-Wert von 8.5 auf 7.9 gesenkt. Da aber bei pH = 7.9 und 0°C langsame Inaktivierung von Acetyl-CoA-Carboxylase stattfindet, ist die Reaktivierung nach Erwärmen vor allem auf die Temperaturänderung zu beziehen. Wie Abb. 18 zeigt, führt eine Erhöhung der Proteinkonzentration zu größeren relativen Aktivitäten. Bei größeren Proteinkonzentrationen finden demnach weniger irreversible Denaturierungen in alkalischem Medium bei 0°C statt. Der parallele Verlauf der Inaktivierungskurven (Abb. 18) weist darauf hin, daß die Inaktivierung nach 1. Ordnung abläuft. Die Reaktionsordnung der Reaktivierung kann mit dieser Versuchsanordnung nicht ohne weiteres eindeutig bestimmt werden, da die nach Temperaturerhöhung gemessenen Aktivitätswerte nicht allein durch die Reaktivierung, sondern auch durch eine langsam ablaufende Inaktivierung bestimmt werden.

Die Versuchsanordnung erscheint geeignet, den Einfluß von Citrat auf die reversible Inaktivierung von Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase in Analogie zu den Experimenten Numa und Ringelmanns (56) zu untersuchen. Numa und Ringelmann (56) zeigten, daß Acetyl-CoA-Carboxylase aus Rattenleber in Gegenwart von 10 mM Citrat bei 25°C in Tris-HCl-Puffer mit und ohne Glutathion bei pH = 8.0 unter Aktivitätszunahme polymerisiert. Durch Abkühlen auf 0°C tritt unter Aktivitätsabnahme Depolymerisation auf. Während Citrat auf native Acetyl-CoA-Carboxylase ohne Effekt ist (17), erschien eine Wirkung auf die reversible Inaktivierung und die

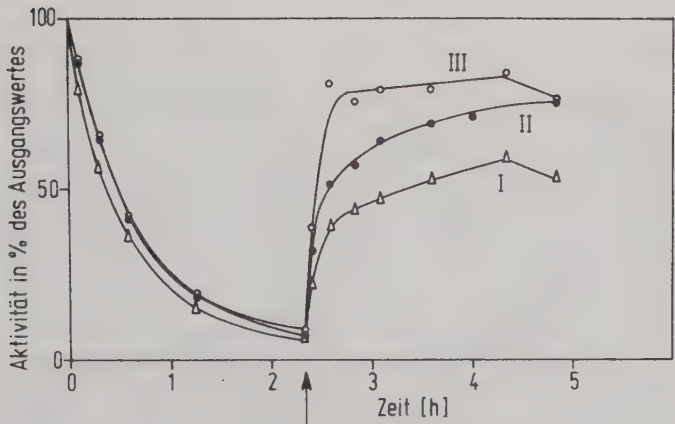


Abb. 18 Abhängigkeit der reversiblen Acetyl-CoA-Carboxylase-Inaktivierung von Temperatur und Proteinkonzentration

Acetyl-CoA-Carboxylase der Phosphocellulose-Fraktion wird bei 25°C mit Puffer aus 0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, und 10 mM Dithiothreitol, pH = 8.5 (0°C), so verdünnt, daß Proteinkonzentrationen von 0.04 mg/ml (I), 0.08 mg/ml (II) und 0.16 mg/ml (III) resultieren. Die drei Ansätze I, II und III unterscheiden sich nur in der Proteinkonzentration. Zum Zeitpunkt 0 werden die Ansätze auf 0°C gekühlt. Der Pfeil zeigt den Zeitpunkt der Erwärmung auf 25°C an. Die Werte der Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivität sind auf die Aktivität zum Zeitpunkt 0 bezogen.

damit vermutlich verbundene Dissoziation und Reassoziierung möglich.

Deswegen wurde Acetyl-CoA-Carboxylase der Phosphocellulose-Fraktion in einem Medium aus 0.1 M Tris-HCl, 10 mM Citrat und 10 mM Dithiothreitol bei pH = 7.9 und 25°C inkubiert. Die anschließende Abkühlung auf 0°C ist mit einer pH-Erhöhung auf pH = 8.5 verbunden. Der Aktivitätsverlauf (Abb. 19, Kurve I) entspricht demjenigen von Acetyl-CoA-Carboxylase aus Rattenleber in dem analogen Experiment Numa und Ringelmanns (56). Ein Kontrollversuch, in dem der Citratzusatz durch einen in der Ionenstärke äquivalenten NaCl-Zusatz ersetzt wurde (Abb. 19, Kurve II), zeigt aber, daß Citrat nicht spezifisch auf die reversible Inaktivierung von Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase wirkt.

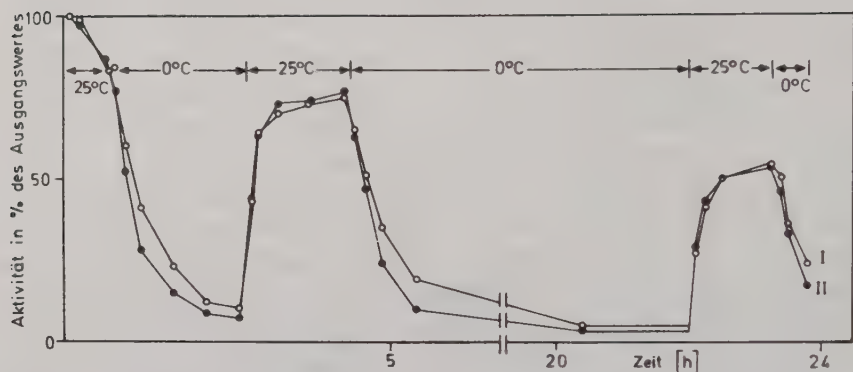


Abb. 19 Einfluß von Citrat auf die Inaktivierung und Reaktivierung von Acetyl-CoA-Carboxylase

Acetyl-CoA-Carboxylase der Phosphocellulose-Fraktion (4 mg/ml in Puffer aus 0.3 M Kaliumphosphat, 50 % (v/v) Glycerin und 5 mM Dithiothreitol, pH = 6.5) wird 1:50 mit Citrat und Dithiothreitol enthaltendem 0.1 M Tris-HCl, pH = 8.5 (0°C), verdünnt, so daß die Endkonzentrationen von Citrat und Dithiothreitol jeweils 10 mM betragen (I). In einem Kontrollversuch (II) wird der Citratzusatz durch einen NaCl-Zusatz (Endkonzentration: 0.06 M) ersetzt. Die Proben werden abwechselnd bei 25°C und 0°C aufbewahrt. Die Kurven I und II zeigen den zeitlichen Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivitätsverlauf unter beiden Versuchsbedingungen.

Einen eindrucksvollen Hemmeffekt auf die Inaktivierung von Acetyl-CoA-Carboxylase aus Bierhefe übt Acetyl-CoA aus. Die Aktivität von Enzym der Phosphocellulose-Fraktion sinkt in 0.1 M Tris-HCl bei 0°C und pH = 8.5 in Gegenwart von $2.3 \cdot 10^{-4}$ M Acetyl-CoA innerhalb von 2 Stunden auf 62 % des Ausgangswertes (Abb. 20, Kurve II). In einem Kontrollversuch ohne Acetyl-CoA fällt die Aktivität dagegen im gleichen Zeitraum auf etwa 5 % des Ausgangswertes (Abb. 20, Kurve I). Die Acetyl-CoA-Konzentration sinkt unter diesen Versuchsbedingungen um weniger als 3 %.

Auf die Reaktivierung von Acetyl-CoA-Carboxylase übt Acetyl-CoA keinen Einfluß aus.

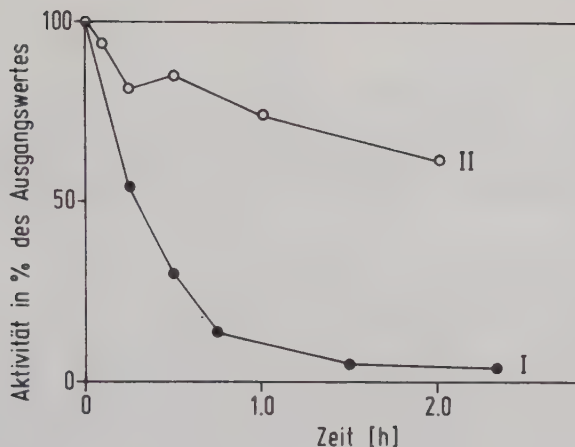


Abb. 20 Einfluß von Acetyl-CoA auf die Inaktivierung von Acetyl-CoA-Carboxylase

Acetyl-CoA-Carboxylase der Phosphocellulose-Fraktion (4 mg/ml in Puffer aus 0.3 M Kaliumphosphat, 50 % (v/v) Glycerin und 5 mM Dithiothreitol, pH = 6.5) wird 1:25 mit 0.1 M Tris-HCl, pH = 8.5 (0°C), verdünnt. Der Tris-Puffer enthält Acetyl-CoA, so daß die Acetyl-CoA-Endkonzentration in der verdünnten Enzymlösung $2.3 \cdot 10^{-4}$ beträgt (Kurve II). Ein Kontrollversuch wird in Abwesenheit von Acetyl-CoA durchgeführt (Kurve I). Es wird der zeitliche Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivitätsverlauf bei 0°C gezeigt.

III. DISKUSSION

Die Untereinheitenstruktur von Acetyl-CoA-Carboxylase aus Hefe wurde mit SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen und Endgruppenbestimmungen untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase durch Natriumdodecylsulfat (SDS) in Proteinkomponenten vom Molekulargewicht 190 000 gespalten wird.

Daß diese Proteinkomponenten getrennte Polypeptidketten und keine Assoziate aus Polypeptidketten darstellen, beweisen die Ergebnisse der C-terminalen Endgruppenbestimmungen mit Carboxypeptidasen. Denn während Carboxypeptidase A keine Aminosäuren aus hitzedenaturierter und SDS-behandelter Acetyl-CoA-Carboxylase abspaltet, setzt Carboxypeptidase B 1 nmol Lysin aus 0.19 mg Acetyl-CoA-Carboxylase frei. Würde das Spaltprodukt, das aus Acetyl-CoA-Carboxylase durch Behandlung mit SDS erhalten wird, ein Dimeres sein, müßte man die Freisetzung von 2 nmol Aminosäure pro 0.19 mg Enzym erwarten. Dementsprechend ist zu schlußfolgern, daß der native Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase-Komplex aus Polypeptidketten des Molekulargewichts 190 000 und der C-terminalen Endgruppe Lysin aufgebaut wird.

Aus der kinetischen Untersuchung der Aminosäurefreisetzung durch Carboxypeptidase B folgt außerdem, daß Leucin vorletzte Aminosäure ist. Demnach ist -Leu-Lys als C-terminale Sequenz der Polypeptidketten anzugeben.

Die N-terminalen Aminosäuren von Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase lassen sich nicht mit der Dansylchlorid-Methode nachweisen und werden durch Leucinaminopeptidase nicht freigesetzt, so daß das Vorliegen einer N-terminalen Blockierung zu vermuten ist.

Die einfachste Erklärung der SDS-Elektrophoresen und Endgruppenbestimmungen besteht darin, daß Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase aus identischen Polypeptidketten zusammengesetzt ist. Aus dieser

Deutung folgt die Forderung, daß die drei für Biotinenzyme charakteristischen Funktionen Biotincarboxylase, Carboxyltransferase und Biotin enthaltende prosthetische Gruppe auf jeder Polypeptidkette von Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase lokalisiert sein müssen.

Nach neueren Untersuchungen von Tanabe et al. (11) besteht auch Rattenleber-Acetyl-CoA-Carboxylase mit großer Wahrscheinlichkeit aus identischen Polypeptidketten des Molekulargewichts 230 000. Da Rattenleber-Acetyl-CoA-Carboxylase eine zusätzliche allosterische Funktion mit einer Citratbindungsstelle besitzt, interpretieren Tanabe et al. (11) ihre Ergebnisse dahingehend, daß vier funktionelle Einheiten kovalent zu einer Polypeptidkette verknüpft sind. Die Acetyl-CoA-Carboxylasen aus Hefe und Rattenleber unterscheiden sich somit deutlich von dem Acetyl-CoA-Carboxylase-System aus *E.coli*, bei dem Biotincarboxylase, Carboxyltransferase und Biotin auf verschiedenen voneinander trennbaren Proteinen lokalisiert sind. Daß die Acetyl-CoA-Carboxylasen aus Hefe und Rattenleber, also aus eukaryoten Zellen, sehr wahrscheinlich aus multifunktionellen Polypeptidketten aufgebaut sind, bestätigt die in der Einführung erläuterte Auffassung, daß sich Systeme aus einzelnen trennbaren Enzymen im Rahmen der Enzymevolution in hochgeordnete Multienzymkomplexe mit multifunktionellen Polypeptidketten entwickelt haben.

In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase aus *Achromobacter* nach Schiele et al. (57) aus zwei nicht-identischen Polypeptidketten besteht. Während die Untereinheit A eine Carboxyltransferase darstellt, enthält die größere Untereinheit B Biotin und eine Biotincarboxylase in kovalenter Verknüpfung (57). Nach Barden und Taylor (58) weist Pyruvatcarboxylase aus *Pseudomonas citronellolis* eine analoge Untereinheitenstruktur auf. Demnach sind diese beiden Biotinenzyme aus *Achromobacter* und *Pseudomonas citronellolis* in der Enzymevolution zwischen *E.coli*-Acetyl-CoA-Carboxylase und Biotinenzyme eukaryoter Herkunft einzuordnen.

Guchhait et al. (59) berichten, daß nach ihren Experimenten die

Protomeren von Hühnerleber-Acetyl-CoA-Carboxylase aus vier nicht-identischen Polypeptidketten der Molekulargewichte 117 000, 130 000 und 140 000 bestehen. Zwei Polypeptide weisen nach Guchhait et al. (59) ein Molekulargewicht von 117 000 auf. Eines dieser beiden Polypeptide enthält Biotin (59). Lane et al. (60) vermuten, daß Biotincarboxylase, Carboxyltransferase, Biotin und Citratbindungsstelle jeweils einem dieser Polypeptide zuzuordnen sind. Nachdem Tanabe et al. (11) die proteolytische Modifikation von Rattenleber-Acetyl-CoA-Carboxylase gezeigt haben, ist zu diskutieren, ob die bisherigen Ergebnisse über die Untereinheitenstruktur von Hühnerleber-Acetyl-CoA-Carboxylase nicht auch auf Proteolyse während der Reinigungsprozedur zurückzuführen sind.

Sumper et al. (16,17) konnten zeigen, daß Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase in 0.1 M NH_3 in Spaltstücke der Sedimentationskoeffizienten 12 S, 9 S und 6 S dissoziiert. Die 12 S- und 9 S-Spaltstücke identifizierten sie als Trimeres und Dimeres der 6 S-Untereinheit. Die Biotin enthaltende 6 S-Untereinheit, die alle antigenen Determinanten des nativen Enzyms besitzt, konnte durch 8 M Harnstoff und 0.1 M Thioglykol nicht gespalten werden (16). In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, daß die 12 S- und 9 S-Spaltstücke in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nur eine Proteinbande ergeben, die einem Molekulargewicht von 190 000 entspricht. Aus diesem Ergebnis wird abgeleitet, daß das in der vorliegenden Arbeit beschriebene 190 000-Dalton-Polypeptid und die von Sumper et al. (16,17) gefundene 6 S-Untereinheit identisch sind. Damit ist die Zahl der Polypeptidketten, die den nativen Enzymkomplex aufbauen, definiert. Denn Sumper et al. (16,17) konnten nachweisen, daß native Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase aus vier 6 S-Untereinheiten gebildet wird. Somit dürfte der Enzymkomplex vier identische Polypeptidketten des Molekulargewichts 190 000 und der C-terminalen Sequenz -Leu-Lys enthalten.

Die Untersuchung der reversiblen Inaktivierung von Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase gibt einen Einblick in den Zusammenhang zwischen Aktivität und Struktur des Multienzymkomplexes. Besonders aufschlußreich sind Experimente, in denen die Inaktivierung von Acetyl-CoA-Carboxylase in 0.1 M NH_3 erfolgt und nach Sumper

et al. (16,17) mit der Bildung von Trimeren, Dimeren und Monomeren der 6 S-Untereinheit verbunden ist.

In ammoniakalischer Lösung verschwindet nicht nur die Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivität innerhalb weniger Minuten, sondern ebenso auch die Biotincarboxylase-Teilaktivität. Da eine Reaktivierung nach 15 bis 30 Minuten möglich ist, kann die Inaktivierung nicht allein als sekundäre Folge irreversibler Denaturierungen erklärt werden. Daraus folgt, daß das Trimere, Dimere und Monomere der 6 S-Untereinheit keine Gesamt- oder Biotincarboxylase-Teilaktivität besitzen. Dementsprechend ist die definierte räumliche Beziehung im tetrameren Multienzymkomplex erforderlich, um Biotincarboxylase-Teilaktivität und die Gesamtaktivität zu erhalten.

Ähnliche Ergebnisse finden Scrutton et al. (61) mit Hühnerleber-Pyruvatcarboxylase. Dieses tetramere Biotinenzym verliert bei 0°C rasch seine beiden Teilaktivitäten und somit die Gesamtaktivität. Reaktivierung tritt nach Erwärmen auf 25°C ein. Die reversible Inaktivierung von Hühnerleber-Pyruvatcarboxylase ist nach Irias et al. (62) mit einer reversiblen Dissoziation in Monomere verbunden. Im Unterschied zu Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase und Hühnerleber-Pyruvatcarboxylase führt die Dissoziation der tetrameren Struktur von Rattenleber-Pyruvatcarboxylase in Dimere und Monomere nach Rudolph et al. (63) nur zu geringen Aktivitätsverlusten.

Man kann spekulieren, daß die Dissoziation von Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase mit Konformationsänderungen der Untereinheiten verbunden ist, die auch durch Wechselwirkungen in Dimeren und Trimeren nicht verhindert werden können. Der Aktivitätsverlust ist dann entsprechend auf diese Konformationsänderungen zu beziehen.

Daß die Inaktivierung von Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase im alkalischen Medium durch Acetyl-CoA gehemmt wird, erinnert an die Wirkung von β -Methylcrotonyl-CoA auf die β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase aus *Achromobacter* IVS. Nach Schiele und Stürzer (64) hemmt β -Methylcrotonyl-CoA die Dissoziation von β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase und schützt dadurch das Enzym in einer Modellreaktion gegen proteolytischen Abbau durch Chymotrypsin. Schiele

und Stürzer (64) diskutieren die Möglichkeit, daß der proteolytische Abbau von β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase intrazellulär durch die β -Methylcrotonyl-CoA-Konzentration geregelt sein könnte. Möglicherweise ist die Hemmung der Inaktivierung von Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase in alkalischem Medium ähnlich zu deuten.

IV. EXPERIMENTELLES

A. Verwendete Geräte

Beckman L2-65B Ultrazentrifuge
Beckman L3-50 Ultrazentrifuge
Sorvall RC2-B Zentrifuge
Stock-Zentrifuge
Wkf-Zentrifuge (G50K)
Tischzentrifuge, Christ Superspeed Junior
Hettich Mikroliter-Zentrifuge
Fraktionskollektor (Serva)
Säulenchromatographie-Zubehör (Serva)
Schlauchpumpe (Varioperpex, LKB)
Aminosäureanalysator LC 6000 (Biotronik)
mit Philipps-Schreiber PM 8221 und Integrator
(System I, Biotronik)
Flüssigkeitszintillationszähler Mark II, (Nuclear Chicago
Division)
Lyophilisator (WKF L05)
ph-Meter, Modell E 500 (Metrohm)
Zellhomogenisator nach Merckenschlager
Photometer (Eppendorf), mit Kompensations-
schreiber 6511 (Eppendorf)
Zeiss-Spektralphotometer PM QII
Pherograph-Original-Frankfurt für die Hochspannungsträger-
elektrophorese nach Wieland-Pfleiderer (Vetter, Heidelberg-
Wiesloch)
Isoelektrische Fokussierungssäule (110 ml, LKB)

B. Enzyme und Chemikalien

Fettsäuresynthetase aus Bierhefe wurde von S. Hess, RNA-
Polymerase aus E.coli von Dr. Portmann und Dr. Heumann,
alle Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, zur
Verfügung gestellt. Weitere Enzyme:
Leucinaminopeptidase aus Rinderaugenlinsen (Serva)
Carboxypeptidase A aus Rinderpankreas, DFP-behandelt (Serva)

Carboxypeptidase B aus Schweinepankreas, DFP-behandelt,
(Worthington, Biochemical Corp.)

Die übrigen Enzyme wurden von der Firma Boehringer (Mannheim)
bezogen.

Andere Substanzen:

Serumalbumin vom Rind (Behringwerke)

Avidin A (Serva)

Glukagon vom Schwein (Elli Lilly & Co. Indianapolis)

Lysozym vom Huhn (Boehringer, Mannheim)

Dithiothreitol und Aminosäuren (Calbiochem)

DEAE-Sephadex (A25) (Pharmacia Fine Chemicals)

Phosphocellulose P1 (Whatman)

Dansylchlorid (Fluka)

Natriumdodecylsulfat (Serva)

8-¹⁴C-ADP (The Radiochemical Centre, Amersham)

(+)-Biotin (Merck)

2.5-Diphenyloxazol (PPO) und

1.4-Bis-2(5-phenyloxazol)-benzol (POPOP) (Interchem, München)

Ampholine (LKB)

Polyäthylenglykol 6000 (Serva)

p-Toluolsulfonsäure (Merck)

Methansulfonsäure (Fluka)

Tryptamin (Fluka)

Alle übrigen Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt, bezogen
und besaßen die höchste erhältliche Reinheit.

C. Enzymaktivitäten

- a. Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivität wird nach Matsushita et al. (18) mit Hilfe von Fettsäuresynthetase oder Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase bestimmt.
- b. Pyruvatcarboxylase wird nach Young et al. (65) durch Kopplung an die Malatdehydrogenase-Reaktion gemessen.
- c. ATP-Harnstoff-Amidolyase wird nach Roon und Levenberg

(66) mit Hilfe von Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase bestimmt.

d. ATP-ADP-Austauschtest

Die Biotincarboxylase-Teilaktivität wird mit einem ATP-ADP-Austauschtest bestimmt, der grobenteils dem von Lynen et al. (54) beschriebenen Test entspricht. Die Reaktionsmischung enthält in einem Gesamtvolumen von 60 μ l: 20 μ l Puffer aus 0.15 M Tris-SO₄ und 0.03 M MgSO₄, ph = 8.0 (25°C)
5 μ l 0.06 M Kaliumphosphat, ph = 8.0
5 μ l 0.3 M KHCO₃, 5 μ l 0.049 M ATP
5 μ l 0.049 M ADP, 5 μ l 0.12 M EDTA
5 μ l 8-¹⁴C-ADP (43 μ Ci/ml) und 10 μ l Acetyl-CoA-Carboxylase-Lösung. Die Reaktion wird durch den Enzymzusatz gestartet. Die Mischung wird 5 min bis 30 min bei 25°C inkubiert und anschließend mit 6 μ l Essigsäure versetzt. Nach Abkühlen auf 0°C wird die Mischung in der Hettich-Mikroliter-Zentrifuge zentrifugiert (5 min bei 10⁴ g). Aliquote des Überstands (25 bis 50 μ l) werden punktförmig auf Schleicher & Schleicher-Papier (2040 b, mit Säure gewaschen) aufgetragen und in 0.1 M Citratpuffer, ph = 3.1, im Pherographen-Original-Frankfurt nach Wieland-Pfleiderer einer Hochspannungselektrophorese (60 min; 50 Volt/cm) unterworfen. Die Nucleotide werden nach Beendigung der Elektrophorese und Trocknen des Papiers mit Hilfe der Fluoreszenzlöschung im UV-Bereich identifiziert. Die entsprechenden Flecken werden herausgeschnitten und in eine Lösung aus 5 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO) und 0.3 g 1,4-Bis-2(5-phenyloxazol)-benzol (POPOP) in 1 l Toluol gegeben. Die Radioaktivität wird im Flüssigkeitszintillationszähler gemessen. Blindwerte werden ohne Enzym bei sonst gleicher Zusammensetzung der Testmischung erhalten.

D. Darstellung und Bestimmung von Acetyl-CoA

Acetyl-CoA wird durch Acetylierung von Coenzym A mit Acetanhydrid nach Ochoa (67) dargestellt und nach Decker (68) bestimmt.

E. Proteinbestimmung

Protein wird bei den ersten Anreicherungs-schritten mit der Biuret-Methode nach Beisenherz et al. (20), bei Präparationen mit einer spezifischen Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivität über 4 E/mg zum Teil auch nach Warburg und Christian (21) bestimmt.

F. Isolierung von Acetyl-CoA-Carboxylase aus Bierhefe

Alle Anreicherungs-schritte werden bei 0°C bis +6°C durchgeführt. 1 kg (Feuchtwicht) Bierhefe von Löwenbräu aus der stationären Wachstumsphase einer Reinkultur vor der 1. Gärführung wird ein- bis zweimal mit 0.1 M Kaliumphosphat, ph = 6.5, gewaschen und jeweils durch Zentrifugation (20 min bei 4000 g) wiedergewonnen.

Schritt 1: Zellaufschluß

Der Zellaufschluß erfolgt nach Sumper und Riepertinger (17) in dem von Merckenschlager et al. (19) entwickelten Homogenisator. Dazu wird die gewaschene Hefe in 1.5 l Puffer aus 0.2 M Kaliumphosphat, 5 mM Dithiothreitol und 1 mM EDTA, ph = 6.5, im Eiswasserbad auf 0°C gekühlt und unmittelbar vor Beginn des Schüttelvorgangs unter intensivem Rühren mit einem möglichst kleinen Volumen aus äthanolischem Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) zu einer Endkonzentration von 15 mM versetzt. Anschließend werden jeweils 250 ml Suspension mit 250 g Glasperlen der Größe 31/10 (Dragonwerk Wild) unter Kühlung 40 sec bei 4500 Upm geschüttelt. Die Temperatur des Schüttelguts beträgt nach Beendigung der Homogenisation +2 bis +4°C. Nach Abnutschen der Glasperlen wird die Suspension nochmals mit 10 mM äthanolischem PMSF (Endkonzentration) versetzt und anschließend 40 min bei 4000 g zentrifugiert.

Schritt 2: Ammoniumsulfatfällung

Zum Überstand aus Schritt 1 wird feingemahlenes Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 40 % innerhalb von 15 min portionsweise zugesetzt. Nach 15 min Rühren wird die Suspension 30 min bei 27 6000 g zentrifugiert. Der trübe Überstand wird von dem weichen Rückstand durch Absaugen getrennt.

Schritt 3: Ultrazentrifugation

Der Rückstand aus Schritt 2 wird in 250 ml Puffer aus 0.1 M Kaliumphosphat und 5 mM Dithiothreit, $\text{pH} = 6,5$, aufgenommen. Die Suspension wird mit äthanolischem PMSF zu einer Endkonzentration von 5 mM versetzt, etwa 30 min gerührt und dann 2 Stunden bei 105 000 g zentrifugiert.

Schritt 4: 1. Polyäthylenglykolfraktionierung

Zu dem Überstand aus Schritt 3 wird Puffer aus 0.1 M Kaliumphosphat, $\text{pH} = 6.5$, 5 mM Dithiothreit und Ammoniumsulfat getropft, bis die Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivität pro Volumeneinheit 0.8 E/ml und die Ammoniumsulfatkonzentration 5 % (w/v) beträgt. Der pH -Wert sinkt durch den Ammoniumsulfatzusatz auf 6.0. Dann wird innerhalb von 3 bis 5 min wäßriges 50 % (w/v) Polyäthylenglykol 6000 getropft, bis eine Polyäthylenglykolkonzentration von 4.6 % (w/v) erreicht ist. Die Suspension wird anschließend sofort 20 min bei 15 000 g zentrifugiert. Der optisch klare, leicht gelbgefärbte Überstand wird mit einer Spritze vom weichen Rückstand entfernt. Der Lösung wird dann innerhalb von 10 min 50 % (w/v) Polyäthylenglykol 6000 bis zu einer Endkonzentration von 9 % (w/v) zugetropft. Die erhaltene Suspension wird 30 min gerührt und 30 min bei 27 600 g zentrifugiert.

Schritt 5: 2. Polyäthylenglykolfraktionierung

Der Rückstand aus Schritt 4 wird in Puffer aus 0.1 M Kaliumphosphat, 5 % (w/v) Ammoniumsulfat und 5 mM Dithiothreit, $\text{pH} = 7.0$, aufgenommen und mit diesem Puffer bis zu einer Proteinkonzentration von 4 mg/ml verdünnt. Anschließend wird die leicht getrübe Lösung

innerhalb von 3 bis 5 min tropfenweise mit wäßrigem 50 % (w/v) Polyäthylenglykol 6000 bis zu einer Polyäthylenglykolendkonzentration von 6 % (w/v) versetzt. Nach anschließender Zentrifugation (20 min, 15 000 g) wird das Dekantat innerhalb von 10 min durch Zutropfen der Polyäthylenglykollösung auf eine Endkonzentration von 11 % (w/v) Polyäthylenglykol 6000 gebracht, 30 min gerührt und dann 30 min bei 27 600 g zentrifugiert.

Schritt 6: DEAE-Sephadex (A25)-Chromatographie

Auf eine DEAE-Sephadex (A25)-Säule (2x56 cm), die mit Puffer aus 0.1 M Imidazol-HCl, 20 % (v/v) Glycerin und 5 mM Dithiothreitol, pH = 7.2, äquilibriert ist, wird der in etwa 5 ml Äquilibrierpuffer gelöste Rückstand aus Schritt 5 gepumpt. Elution erfolgt mit einem linearen Gradienten zwischen 610 ml 50 mM NaCl in Äquilibrierpuffer und 610 ml 300 mM NaCl in Äquilibrierpuffer. Die Durchflußgeschwindigkeit beträgt 22 ml/cm²h. Das Elutionsvolumen von Acetyl-CoA-Carboxylase liegt bei etwa 510 ml. Die Acetyl-CoA-Carboxylase enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und mit 2.5 % Rinder-serumalbumin in Äquilibrierpuffer zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml Albumin versetzt. Anschließend wird die Proteinlösung mit festem Polyäthylenglykol 6000 versetzt (35 g zu 100 ml Lösung), 60 min gerührt und 60 min bei 105 000 g zentrifugiert.

Schritt 7: Phosphocellulose-Chromatographie

Phosphocellulose (P 1) der Firma Whatman wird in Anlehnung an die Vorschläge Petersons (69) für eine (2x22 cm)-Säule vorbereitet. Die Säule wird mit Puffer aus 0.05 M Kaliumphosphat, 20 % (v/v) Glycerin und 5 mM Dithiothreitol, pH = 6.5, äquilibriert. Nachdem der in 5 bis 10 ml Äquilibrierpuffer gelöste Rückstand aus Schritt 6 auf diese Säule gepumpt ist, erfolgt Elution mit einem linearen pH- und Konzentrationsgradienten, der zwischen 380 ml Äquilibrierpuffer und 380 ml Puffer aus 0.5 M Kaliumphosphat, 20 % (v/v) Glycerin und 5 mM Dithiothreitol, pH = 7.5, aufgebaut wird. Die Durchflußgeschwindigkeit beträgt etwa 40 ml/cm²h. Das Elutionsvolumen von Acetyl-CoA-Carboxylase liegt bei etwa 190 ml. Die Acetyl-CoA-Carboxylase enthaltenden Fraktionen werden vereinigt, mit festem Polyäthylenglykol

6000 versetzt (35 g zu 100 ml Lösung), 60 min gerührt und dann 60 min bei 105 000 g zentrifugiert. Der Rückstand wird in Puffer aus 0.3 M Kaliumphosphat, 50 % (v/v) Glycerin und 5 mM Dithiothreitol, pH = 6.5, gelöst und bei -15°C bis -20°C aufbewahrt.

Gelschritt

In einigen Versuchen wird ein Gelschritt nach der 2. Polyäthylenglykolfraktionierung (Schritt 5) durchgeführt. Dazu wird der Rückstand aus Schritt 5 in Puffer aus 0.1 M Kaliumphosphat, 20 % (v/v) Glycerin und 5 mM Dithiothreitol, pH = 6.5, zu einer Proteinkonzentration von etwa 2 % gelöst. Nach Keilin und Hartree (70) präpariertes Calciumphosphatgel wird 5 min bei 4000 g zentrifugiert. Zum Rückstand wird die Proteinlösung gegeben. Das Volumen des Calciumphosphatgels ist so gewählt, daß das Gel-Protein-Verhältnis 5:1 beträgt. Die Protein-Gel-Mischung wird bei 0°C bis zur Homogenität und anschließend weitere 15 min gerührt. Der durch Zentrifugation (10 min, 4000 g) erhaltene Rückstand wird dreimal mit je 40 ml Puffer aus 0.033 M Kaliumphosphat, 20 % (v/v) Glycerin und 5 mM Dithiothreitol, pH = 7.5, gewaschen. Die Kontaktzeit beträgt jeweils 10 min bei 0°C. Die Wiedergewinnung des Gels erfolgt durch 5 min Zentrifugation bei 4 000 g. Das Enzym wird anschließend durch viermalige Elution mit je 40 ml Puffer aus 0.1 M Kaliumphosphat, 20 % (v/v) Glycerin und 5 mM Dithiothreitol, pH = 7.5, erhalten. Kontaktzeit und Zentrifugationsbedingungen stimmen mit den entsprechenden Werten der Waschprozedur überein. Je 100 ml Enzymlösung werden dann mit 35 g Polyäthylenglykol 6000 versetzt und nach einstündigem Rühren 30 min bei 105 000 g zentrifugiert. Der Rückstand wird dann in Schritt 6 eingesetzt.

G. Isoelektrische Fokussierung mit einer Elektrofokussiersäule

1 bis 5 mg Acetyl-CoA-Carboxylase aus verschiedenen Reinigungsschritten werden in die Mitte einer Elektrofokussiersäule eingepumpt. Die benutzte Säule von LKB, Schweden, besitzt ein Volumen von 110 cm³ und ist mit Platinelektroden, sowie einem doppelten Kühlmantel ausgestattet. Die Polung erfolgt so, daß die obere Elektrode als Anode, die zentrale Elektrode als Kathode geschaltet wird. Zur Ausbildung eines pH-Gradienten werden als Trägerampholyte

aliphatische Polyamino-polycarbonsäuren (Ampholine von LKB) mit pI-Bereichen von 3.5 bis 10 und 4 bis 6 eingesetzt. Zur Stabilisierung gegen Konvektionsströmungen wird ein linearer Dichtegradient aus Rohrzucker (0 - 47 %) oder Glycerin (20 - 55 % (w/v)) entsprechend den Angaben Vesterbergs (22) aufgebaut. Die Elektrofokussierung erfolgt bei +3°C, 1 bis 2 % Ampholine, in 5 mM Dithiothreitol und einer Anfangsleistung von 2 W bei stabilisierter Spannung mit einer Laufzeit von 20 bis 24 Stunden. Vom Eluat wird die Absorption bei 280 nm, pH und Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivität gemessen.

H. Polyacrylamidgel-Elektrophoresen

a. Disk-Elektrophoresen

Disk-Elektrophoresen werden mit dem System 1 nach Maurer (24) in zylindrischen Gelen (0.5 x 7 cm) durchgeführt. Die Acrylamidkonzentration der Trenngellösung wird auf 6 % gesenkt. Auf das Trenngel wird ein weitmaschiges Obergel chemisch polymerisiert. Die Lösung für das Obergel enthält 3.75 % Acrylamid und 0.1 % Methylenbisacrylamid und ist im übrigen wie die Trenngellösung zusammengesetzt.

b. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen werden in Platten-gelen (130x115x16 mm) mit einer im Laboratorium von Zillig, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, entwickelten Apparatur durchgeführt. Zwischen zwei Glasplatten wird eine Mischung der beiden Gellösungen I und II von unten gepumpt, so daß von oben nach unten ein linearer Gradient von 5 bis 15 % Acrylamid entsteht. Die Zusammensetzung der Gellösungen entspricht weitgehend den Angaben Laemmli (28). Gellösung I enthält 5 % Acrylamid, 0.13 % Methylenbisacrylamid, 0.375 M Tris-HCl, pH = 8.8, 0.33 % SDS, 0.01 % (w/v) Tetramethyläthyldiamin (TEMED) und 0.25 mg Ammoniumpersulfat/ml. Gellösung II enthält 15 % Acrylamid, 0.4 % Methylenbisacrylamid, 0.375 M Tris-HCl, pH = 8.8, 0.08 % SDS, 0.01 % (w/v) Tetramethyläthyldiamin und 0.25 mg Ammoniumpersulfat/ml. Das Gradientengel wird mit

Wasser überschichtet. Nach der Polymerisation wird das Wasser abgegossen und ein weitmaschiges Obergel aufpolymerisiert. Durch einen Kunststoffkamm, der von oben zwischen die Platten gedrückt wird, werden die Taschen zum Auftragen der Proben gebildet. Die Obergellösung enthält 3 % Acrylamid, 0.08 % Methylenbisacrylamid, 0.125 M Tris-HCl, $\text{ph} = 6.8$, 0.1 % SDS, 0.025 % (w/v) Tetramethyläthylendiamin und 0.6 mg Ammoniumpersulfat/ml. Die Proteinspaltung erfolgt in Gegenwart von 2 % SDS, 5 % (w/v) Thioglykol (d.i. 640 mM), 8 M Harnstoff, 0.0625 M Tris-HCl, $\text{ph} = 6.8$, bei 75°C oder bei 37°C . Die Proteinkonzentration im Spaltansatz beträgt in der Regel 0.1 mg/ml. Vor dem Auftragen wird der Spaltansatz mit dem gleichen Volumen einer Lösung aus 2 % SDS, 5 % (w/v) Thioglykol, 0.0625 M Tris-HCl, $\text{ph} = 6.8$, 0.004 % Bromphenolblau und 60 % (v/v) Glycerin verdünnt. Die Elektrophorese erfolgt bei $+2^{\circ}\text{C}$ und 125 V über einen Zeitraum von 12 bis 15 h. Als Elektrodenpuffer wird der Tris-Glycin-Puffer ($\text{ph} = 8.3$) nach Laemmli (28) eingesetzt. Die Gele werden nach der Elektrophorese 24 bis 48 h bei Raumtemperatur in einem Färbebad aus 1.25 g Coomassie Brilliant Blue R 250, 454 ml 50 % (v/v) Methanol und 46 ml Eisessig angefärbt. Entfärbung findet in einer Lösung aus 75 ml Eisessig, 100 ml Methanol und 825 ml Wasser statt.

I. Aminosäureanalyse

Die Aminosäureanalyse von Aminosäuregemischen erfolgt im Aminosäureanalysator (Biotronik) mit angeschlossenem Integrator (System I, Biotronik). Die Aminosäuregemische werden auf eine Kationenaustauschersäule (Durrum DC-6A) gepumpt und mit Lithium- oder Natriumcitratpuffersystemen (71) eluiert. Die Aminosäuren werden mit Ninhydrin-Reagenz (71) nachgewiesen.

K. Proteinhydrolyse

Protein wird mit 6 N HCl, 3 N p-Toluolsulfonsäure oder 4 N Methansulfonsäure hydrolysiert.

a. Hydrolyse mit HCl

Die Methode der HCl-Hydrolyse von Acetyl-CoA-Carboxylase entspricht Vorschlägen von Hare (31), Blackburn (32) und von Tristram und Smith (33).

60 bis 100 μg Acetyl-CoA-Carboxylase werden 20 h bei $+2^{\circ}\text{C}$ gegen ein großes Volumen H_2O dialysiert. Anschließend werden gleichgroße Volumina in 3 ausgezogene dickwandige Reagenzgläser (19x1,3 cm) gegeben. Nach Lyophilisation bis zur Trocknen wird jeweils 1 ml 6 N HCl (konstant siedende HCl) mit 0.1 % (v/v) Thioglykol und 0.1 % Phenol zugesetzt. Die Reagenzgläser werden in flüssigem Stickstoff eingefroren, im Ölpumpenvakuum unter langsamem Auftauen evakuiert und zugeschmolzen. Die Hydrolyse findet bei 106°C statt. Nach 24, 48 und 72 h wird jeweils ein Reagenzglas geöffnet und sofort am Rotationsverdampfer (Badtemperatur: 40°C) getrocknet. Der Rückstand wird in einem definierten Volumen Probenverdünnungspuffer (71) aufgenommen und zur Entfernung unlöslicher Bestandteile zentrifugiert (5 min bei 10^4 g , Hettich Mikroliter-Zentrifuge).

b. Hydrolyse mit 3 N p-Toluolsulfonsäure

Die Hydrolyse mit 3 N p-Toluolsulfonsäure entspricht den Angaben von Liu (34). 60 bis 100 μg Acetyl-CoA-Carboxylase werden wie zur HCl-Hydrolyse vorbereitet, also gegen H_2O dialysiert und zur Trocknen lyophilisiert. Anschließend werden jeweils 250 μl frisch hergestellter 3 N p-Toluolsulfonsäure mit 0.2 % Tryptamin zugesetzt. Die Reagenzgläser werden wie bei der Methode der HCl-Hydrolyse evakuiert und zugeschmolzen. Die Hydrolyse erfolgt 48 h bei 106°C . Nach Öffnen der Reagenzgläser wird die Aminosäurelösung mit 3.5 N NaOH oder 3.5 N LiOH auf $\text{ph} = 2.0$ bis $\text{ph} = 2.2$ gebracht und mit Probenverdünnungspuffer (71) auf ein definiertes Volumen aufgefüllt. Ob LiOH oder NaOH eingesetzt werden, hängt davon

ab, mit welchem Citratpuffersystem der Aminosäure-analysator betrieben wird. Wird das Lithiumcitrat-puffersystem benutzt, werden die Trennergebnisse durch hohe Natriumionenkonzentrationen in der Probenlösung verschlechtert.

c. Hydrolyse mit 4 N Methansulfonsäure

Die Proteinhydrolyse mit 4 N Methansulfonsäure und 0.2 % Tryptamin erfolgt nach Moore (35). Protein wird wie zur HCl-Hydrolyse vorbereitet und dann in mindestens 250 μ l frisch hergestellter 4 N Methansulfonsäure und 0.2 % Tryptamin 24 h bei 115°C hydrolysiert. Die weitere Aufarbeitung entspricht dem Verfahren nach Hydrolyse mit p-Toluolsulfonsäure.

L. Perameisensäure-Oxidation

Protein wird nach Hirs (36) mit Perameisensäure oxidiert. 60 bis 100 μ g Acetyl-CoA-Carboxylase werden wie zur HCl-Hydrolyse gegen H₂O dialysiert und anschließend auf ein Volumen von etwa 50 μ l durch Lyophilisation konzentriert. Die Enzymlösung wird anschließend 4 h bei 0°C mit frisch hergestelltem Perameisensäure-Reagenz (2 ml) inkubiert. Das Perameisensäure-Reagenz wird durch Mischung von 1 ml 30 % H₂O₂, 8 ml Ameisensäure und 1 ml H₂O und anschließende einstündige Inkubation bei 23°C hergestellt. Nach Abkühlung auf 0°C wird es sofort eingesetzt. Das Reagenz wird aus der Protein enthaltenden Mischung entfernt, indem die Mischung mit einem großen Volumen H₂O (80 ml) bei +2°C verdünnt und anschließend zur Trocknen lyophilisiert wird. Diese Prozedur wird dreimal mit jeweils kleineren H₂O-Zusatz-Volumina wiederholt.

M. Endgruppenbestimmungen

- a. Die Endgruppenbestimmung der Aminoendgruppe mit Hilfe von Dansylchlorid wird nach Gray (38) und Hartley (39) mit einer veränderten Dansylierungsmethode durchgeführt.

95 µg Acetyl-CoA-Carboxylase in Puffer werden mit festem SDS zu einer Endkonzentration von 1 % in einem kleinen Reagenzglas (4 x 40 mm) versetzt. Die Mischung wird 10 bis 15 min bei 80°C gehalten und anschließend 10 Stunden bei Raumtemperatur gegen 1 % SDS-H₂O dialysiert. Die farblose Lösung wird durch Lyophilisation bis zu einem Volumen von etwa 50 µl konzentriert, mit 50 µl N-Äthylmorpholin versetzt und gründlich gemischt. Dann werden der Lösung 75 µl einer frisch hergestellten Lösung aus 25 mg Dansylchlorid/ml Dimethylformamid zugesetzt. Nach Durchmischen wird die gelbgefärbte Lösung 4 h bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach anschließendem Zusatz von 500 µl Aceton bildet sich innerhalb von 1 h ein flockiger Niederschlag, der in der Tischzentrifuge (10 min, 4000 g) abzentrifugiert wird. Der Rückstand wird etwa 30 min im Ölpumpenvakuum getrocknet und mit 50 µl 6 N HCl (konstant siedende HCl) versetzt. Die Reaktionsgefäße werden dann im Ölpumpenvakuum unter gleichzeitiger Kühlung in flüssigem Stickstoff gründlich entgast, zugeschmolzen und 16 h bei 106°C gehalten. Nach dem Abkühlen werden die Reaktionsgefäße geöffnet und über festem NaOH im Ölpumpenvakuum getrocknet. Der Rückstand wird nach Fujiki (72) mit 10 µl einer Aceton-1 N HCl-Mischung (19:1) versetzt. 1 µl dieser Mischung wird auf Polyamid-Blätter der Firma Schleicher und Schüll (7.5 x 7.5 cm) nach Woods und Wang (42) aufgetragen und mit den von Hartley (39) vorgeschlagenen Laufmitteln chromatographiert. Die Differenzierung von O-Dansyltyrosin und N-Dansylglutaminsäure erfolgt nach Gottlieb et al. (44). Die Differenzierung zwischen N-Dansylhistidin und den übrigen monodansylierten basischen Aminosäuren gelingt nach Jörnvall (43).

b. Verdauung mit Leucinaminopeptidase

Die Methode, N-terminale Aminosäuren durch Verdauung mit Leucinaminopeptidase zu bestimmen, wird von Light (45) übernommen. 0.5 bis 1.0 nmol der Acetyl-CoA-Carboxylase-Untereinheit werden 20 h bei +2°C gegen 0.1 M Tris-HCl,

0.0025 M MgCl_2 , $\text{pH} = 8.6$, dialysiert. Anschließend werden 5 μl Leucinaminopeptidase ($\approx 10 \mu\text{g}$ Protein) aus Rinderaugenlinsen zugesetzt. Diese Enzymmenge besitzt nach Angabe des Herstellers (Serva) gegen Leucinamid eine Aktivität von 4000 mE. Die Mischung aus Acetyl-CoA-Carboxylase und Leucinaminopeptidase wird in Eppendorf-caps mehrere Stunden bei 23°C oder 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zusatz von 10 % (v/v) Essigsäure (Endkonzentration) beendet, sofort mit Probenverdünnungspuffer (71) 1:2 bis 1:3 verdünnt und im Eiswasserbad gekühlt. Nach Zentrifugation in der Hettich-Zentrifuge (5 min, 10^4 g) wird der Überstand in den Aminosäureanaly-sator eingespritzt. Blindwerte werden erhalten, indem das Verdauungsexperiment ohne Leucinaminopeptidase, beziehungsweise ohne zu verdauendes Protein durchgeführt werden. Die Verdauung von Glukagon erfolgt analog, allerdings ohne vorherige Dialyse.

c. Verdauung mit Carboxypeptidasen

Bei der Bestimmung von C-terminalen Aminosäuren mit den Carboxypeptidasen A und B werden Vorschläge von Harris (46), Neurath (47,52) und Ambler (48) berücksichtigt. Vorbereitung der Carboxypeptidasen: Es werden Carboxypeptidasen benutzt, die mit Di-isopropyl-fluorophosphat (DFP) vorbehandelt sind. Carboxypeptidase B aus Schweinepankreas (Worthington) wird 1:100 mit 0.2 M N-Äthylmorpholinacetat, $\text{pH} = 8.5$, verdünnt und ohne weitere Reinigung sofort eingesetzt. DFP-vorbehandelte Carboxypeptidase A aus Rinderpankreas (Serva) enthält so viele Aminosäuren, daß eine Reinigung unmittelbar vor dem Verdauungsexperiment unerlässlich ist. Das von Harris (46) vorgeschlagene Reinigungsverfahren wird übernommen.

Vorbereitung des zu verdauenden Proteins: Als besonders günstig erweist sich die Hitzedenaturierung des zu verdauenden Proteins vor der Inkubation mit den Carboxypeptidasen. Dazu werden 0.5 bis 3.4 nmol Substrat

(Acetyl-CoA-Carboxylase-Untereinheit vom Molekulargewicht 190 000, Lysozym, Glukagon) in 0.2 M N-Äthylmorpholinacetat, 0.056 % Natriumdodecylsulfat (SDS), $\text{pH} = 8.5$, 5 bis 10 min auf 80°C erhitzt und anschließend unter vorsichtigem Schütteln auf 23°C abgekühlt. Als Reaktionsgefäße werden Eppendorfcaps benutzt. Die Konzentration der Proteinlösung liegt zwischen 5 bis 15 μM und beträgt in der Regel bei Versuchen mit Acetyl-CoA-Carboxylase 6 μM ($\approx 1 \text{ mg/ml}$ Protein).

Verdauungsbedingungen:

Nach Hitzedenaturierung und Abkühlung auf 23°C wird die Proteinlösung bei 23°C oder 37°C mit Carboxypeptidase inkubiert. Das molare Substrat-Enzym-Verhältnis wird in den einzelnen Versuchen von 60:1 bis 3,7:1 variiert. Beendigung der Reaktion und weitere Aufarbeitung erfolgen wie bei den Verdauungsexperimenten mit Leucinaminopeptidase. Blindwerte werden erhalten, indem Versuche ohne zu verdauendes Protein, beziehungsweise ohne Carboxypeptidase durchgeführt werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Untereinheitenstruktur von Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase und der Zusammenhang zwischen Struktur und Aktivität werden untersucht. Im einzelnen werden die folgenden Ergebnisse erzielt:

1. Acetyl-CoA-Carboxylase wird 1500- bis 1900fach aus Bierhefe zu einer spezifischen Aktivität von maximal 9 E/mg Protein angereichert. Präparationen mit einer spezifischen Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivität von 7 bis 9 E/mg enthalten keine nachweisbare Pyruvatcarboxylase- oder ATP-Harnstoff-Amidolyase-Aktivität. Ihr Reinheitsgrad wird nach Ergebnissen von Glycerindichtegradienten-Zentrifugation und Diskelektrophoresen auf etwa 95 % geschätzt.
2. Der scheinbare isoelektrische Punkt des nativen Enzyms liegt bei 5.4 ± 0.1 .
3. Polyacrylamidgel-Elektrophoresen nach Spaltung mit Natriumdodecylsulfat (SDS) und Endgruppenbestimmungen mit Carboxypeptidasen ergeben, daß Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase aus Polypeptidketten des Molekulargewichts $189\,000 \pm 1530$ und der C-terminalen Sequenz -Leu-Lys aufgebaut wird.
4. N-terminale Aminosäuren von Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase konnten bisher mit Hilfe der Dansylchlorid-Methode oder durch Verdauung mit Leucinaminopeptidase nicht nachgewiesen werden. Es wird vermutet, daß eine N-terminale Blockierung vorliegt.
5. Die Aminosäurezusammensetzung von Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase wird bestimmt und auf die Untereinheit vom Molekulargewicht 189 000 bezogen. Die relativen Aminosäuregehalte von Acetyl-CoA-Carboxylase und Fettsäuresynthetase aus Hefe stimmen weitgehend überein.
6. Die 12 S- und 9 S-Spaltstücke, die nach Sumper et al. (16,17)

in 0.1 M NH_3 aus Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase gebildet werden, zeigen in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nur eine Proteinbande, die einem Molekulargewicht von 189 000 entspricht.

7. In ammoniakalischer Lösung verliert Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase nicht nur die Gesamtaktivität, wie Sumper et al. (16,17) bereits beschrieben haben, sondern auch die Biotincarboxylase-Teilaktivität.
8. Die Inaktivierung in alkalischem Medium wird durch 2.5 M Glycerin, $2,3 \cdot 10^{-4}$ M Acetyl-CoA und Temperaturerhöhung wirksam gehemmt. Die Reaktivierung wird durch Temperaturerhöhung beschleunigt und durch Glycerin konzentrationsabhängig gehemmt. Die Ergebnisse Sumpers et al. (16,17) über die reaktivierende Wirkung von pH-Senkung und Vergrößerung der Ionenstärke werden bestätigt. Citrat beeinflusst die reversible Inaktivierung von Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase nicht spezifisch.

Die Ergebnisse werden dahingehend gedeutet, daß Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase aus identischen trifunktionellen Polypeptidketten des Molekulargewichts 189 000 und der C-terminalen Sequenz -Leu-Lys aufgebaut wird. Es wird angenommen, daß diese Polypeptidketten den von Sumper et al. (16,17) beschriebenen 6 S-Untereinheiten entsprechen. Demnach stellen die 4 6 S-Untereinheiten, die nach Sumper et al. (16,17) den tetrameren Komplex von nativer Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase bilden, identische Polypeptidketten dar. Nach den Untersuchungen der reversiblen Inaktivierung im alkalischen Medium sind die definierten räumlichen Beziehungen in der tetrameren Struktur erforderlich, um die Biotincarboxylase-Teilaktivität und die Acetyl-CoA-Carboxylase-Gesamtaktivität zu erhalten.

LITERATURVERZEICHNIS

1. J. Moss and M.D. Lane, Advan. Enzymology, 36, 321 (1971)
2. R.B. Guchhait, S.E. Polakis, P. Dimroth, E. Stoll, J. Moss, and M.D. Lane, J. Biol. Chem. 249, 6633 (1974)
3. A.W. Alberts and P.R. Vagelos, in: "The Enzymes", 3rd ed. 6, 37 (1972), P.D. Boyer, Ed., Academic Press, New York
4. H.G. Wood, in: "The Enzymes", 3rd. ed. 6, 83 (1972), P.D. Boyer, Ed., Academic Press, New York
5. N.M. Green, R.C. Valentine, N.G. Wrigley, F. Ahmad, B.E. Jacobson, and H.G. Wood, J. Biol. Chem. 247, 6284 (1972)
6. F. Ahmad, D. Lygre, B.E. Jacobson, and H.G. Wood, J. Biol. Chem. 247, 6299 (1972)
7. F. Ahmad, W. Brattin, M. Chuang, B. Jacobson, and H.G. Wood, Fed. Proc. 32, 510 (1973)
8. R.B. Guchhait, J. Moss, W. Sokolski, and M.D. Lane, Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 68, 653 (1971)
9. M.F. Utter, R.E. Barden, and B.L. Taylor, Advan. Enzymology 42, 1 (1975)
10. R.E. Barden, B.L. Taylor, F. Isohashi, W.H. Frey, II, G. Zander, J.C. Lee, and M.F. Utter, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 72, 4308 (1975)
11. T. Tanabe, K. Wada, T. Okazaki, and S. Numa, Eur. J. Biochem. 57, 15 (1975)

12. J.J. Volpe and P.R. Vagelos, *Ann. Rev. Biochem.* 42, 21 (1973)
13. E. Schweizer, B. Kniep, H. Castorph, and U. Holzner, *Eur. J. Biochem.* 39, 353 (1973)
14. M. Grieshaber and R. Bauerle, *Nature New Biology* 236, 232 (1972)
15. J. Yourno, T. Kolmo, and J.R. Roth, *Nature* 228, 820 (1970)
16. M. Sumper und F. Lynen, *Colloquium Ges. Biol. Chem., Mosbach*, 23, 365 (1972)
17. M. Sumper and C. Riepertinger, *Eur. J. Biochem.* 29, 237 (1972)
18. M. Matsushashi, S. Matsushashi, S. Numa und F. Lynen, *Biochem. Z.* 340, 243 (1964)
19. M. Merckenschlager, K. Schlossmann und W. Kurz, *Biochem. Z.* 329, 332 (1957)
20. G. Beisenherz, H.J. Boltze, T. Bücher, R. Czok, K.H. Garbade, E. Meyer-Arendt und G. Pfeleiderer, *Z. Naturforsch.* 8b, 555 (1953)
21. W. Warburg und W. Christian, *Biochem. Z.* 310, 384 (1942)
22. O. Vesterberg, *Methods Enzymol.* 22, 389 (1971)
23. M. Sumper (persönliche Mitteilung)
24. H.R. Maurer, "Disc Electrophoresis", Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York (1971)
25. K. Weber and M. Osborn in: "The Proteins", eds.: H. Neurath and R.L. Hill, Academic Press, New York, San Francisco, London, 1, 180 (1975)

26. A.L. Shapiro, E. Vinuela, and J.V. Maizel, Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 815 (1967)
27. K. Weber and M. Osborn, J. Biol. Chem. 244, 4406 (1969)
28. U.K. Laemmli, Nature 227, 680 (1970)
29. R.F. Martin and B.N. Ames, J. Biol. Chem. 236, 1373 (1961)
30. W. Zillig (persönliche Mitteilung)
31. P.E. Hare in: "Protein Sequence Determination", ed. S.B. Needleman, 2nd edition, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, p. 204 (1975)
32. S. Blackburn, "Amino Acid Determination", Marcel Dekker, Inc., New York (1968)
33. G.R. Tristram and R.H. Smith, Advan. Protein Chem. 18, 227 (1963)
34. T. Liu, Methods Enzymol. 25, 44 (1972)
35. A.T. Moore in: "Chemistry and biology of peptides", ed. J. Meienhofer, Ann. Arbor Science Publishers, p. 629 (1972)
36. C.H.W. Hirs, J. Biol. Chem. 219, 611 (1956)
37. D. Oesterhelt, H. Bauer, and F. Lynen, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 63, 1377 (1969)
38. W.R. Gray, Methods Enzymol. 15, 121 (1972)
39. B.S. Hartley, Biochem. J. 119, 805 (1970)
40. B.S. Hartley and V. Massey, Biochim. Biophys. Acta 21, 58 (1956)

41. C. Gros and B. Labouesse, *Eur. J. Biochem.* 7, 463 (1969)
42. K.R. Woods and K.T. Wang, *Biochim. Biophys. Acta* 133, 369 (1967)
43. H. Jörnvall, *Eur. J. Biochem.* 14, 521 (1970)
44. P.D. Gottlieb, B.A. Cunningham, U. Rutishauser, and G.M. Edelman, *Biochemistry* 9, 3155 (1970)
45. A. Light, *Methods Enzymol.* 25, 253 (1972)
46. J.I. Harris, *Methods Biochem. Anal.* 2, 397 (1955)
47. H. Neurath, in: "The Enzymes", P.D. Boyer, H. Lardy, and K. Myrbäck, eds., Academic Press, New York, 4, 11 (1960)
48. R.P. Ambler, *Methods Enzymol.* 25, 143 (1972)
49. J.V. Benson, Jr., M.J. Gordon, and J.A. Patterson, *Anal. Biochem.* 18, 228 (1967)
50. E.W. Davie and H. Neurath, *J. Am. Chem. Soc.* 74, 6305 (1952)
51. M.A. McDowall and E.L. Smith, *J. Biol. Chem.* 240, 281 (1965)
52. H. Neurath (persönliche Mitteilung)
53. E.W. Davie, C.R. Newman, and P.E. Wilcox, *J. Biol. Chem.* 234, 2635 (1959)
54. F. Lynen, J. Knappe, E. Lorch, G. Jütting, E. Ringelmann und J. Lachange, *Biochem. Z.* 335, 123 (1961)
55. N.M. Green, *Advan. Protein Chem.* 29, 85 (1975)

56. S. Numa und E. Ringelmann, Biochem. Z. 343, 258 (1965)
57. U. Schiele, R. Niedermeier, M. Stürzer, and F. Lynen, Eur. J. Biochem. 60, 259 (1975)
58. R.E. Barden and B.L. Taylor, Fed. Proc. 32, 510 (1973)
59. R.B. Guchhait, E.E. Zwergel, and M.D. Lane, J. Biol. Chem. 249, 4776 (1974)
60. M.D. Lane, S.E. Polakis, and J. Moss, in: "Subunit Enzymes", ed. K.E. Ebner, Marcel Dekker, Inc. New York, p. 181 (1975)
61. M.C. Scrutton, D.B. Keech, and M.F. Utter, J. Bio. Chem. 240, 574 (1965)
62. J.J. Irias, M.R. Olmsted, and M.F. Utter, Biochemistry 8, 5136 (1969)
63. F.B. Rudolph, K. Nakashima, T. Wakabayashi, and H.A. Lardy, personal communication to Utter et al. (9)
64. U. Schiele and M. Stürzer, Eur. J. Biochem. 60, 267 (1975)
65. M.R. Young, B. Tolbert, and M.F. Utter, Methods Enzymol. 13, 250 (1969)
66. R.J. Roon and B. Levenberg, Methods Enzymol. 17, 317 (1970)
67. S. Ochoa, Methods Enzymol. 1, 688 (1955)
68. K. Decker in: "Methoden der enzymatischen Analyse", Herausgeber H.U. Bergmeyer, Verlag Chemie, Weinheim (1970)
69. E.A. Peterson: "Cellulosic Ion Exchangers", in: "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", editors: T.S. Work and E. Work, North-Holland Publishing Comp., N.Y., (1970)

70. D. Keilin and E.F. Hartree, Proc. Roy. Soc. (London)
B124, 397 (1938)
71. Handbuch der Aminosäureanalyse, Biotronik
72. H. Fujiki (persönliche Mitteilung)

Lebenslauf

Name: Joachim S p i e ß

Geburtsdatum: 20. April 1940

Geburtsort: Lüdenscheid

Schulen:

1947 - 1960 Volksschule und Oberschule (neusprachliches und mathematisch-naturwissenschaftliches Zeppelin-Gymnasium, Lüdenscheid)

1960 Abitur

1960 - 1961 Wehrdienst

Akademische Ausbildung:

1961 - 1968 Medizinstudium an der Universität München

1964 - 1967 medizinische Dissertation über die Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels (Pasteur Effekt) unter Anleitung von Priv.-Doz. Dr. E. Meyer am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität München (Direktor: Professor Dr. Th. Bücher).

1968 medizinisches Staatsexamen

1968 - 1972 Chemiestudium an der Universität München

1972 chemische Hauptdiplomprüfung

1973 ärztliche Approbation

1973 - 1976 chemische Dissertationsarbeit über "Untersuchungen zur Struktur von Acetyl-CoA-Carboxylase aus Hefe" unter Anleitung von Professor Dr. F. Lynen, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, und Institut für Biochemie der Universität München.

5. März 1976

